

Energimetabolisme i myotuber fra
utholdenhetstrente og utrente unge menn
*Utholdenhetstrening stimulerer fettsyremetabolismen og
bedrer metabolsk fleksibilitet av myotuber*

Masteroppgave for graden Master i farmasi



Siw Anette Helle

Seksjon for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

2014/2015

Energimetabolisme i myotuber fra utholdenhetstrening og utrente unge menn

*Utholdenhetstrening stimulerer fettsyremetabolismen og
bedrer metabolsk fleksibilitet av myotuber*

Masteroppgave for graden Master i farmasi



Siw Anette Helle

Seksjon for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

2014/2015

Veiledere:

Professor Arild C. Rustan

Professor G. Hege Thoresen

Stipendiat Jenny Lund

© Siw Anette Helle

2015

Energimetabolisme i myotuber fra utholdenhetstrening og utrente unge menn

Utholdenhetstrening stimulerer fettsyremetabolismen og bedrer metabolsk fleksibilitet av myotuber

Siw Anette Helle

<http://www.duo.uio.no>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Seksjon for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo i perioden august 2014 til mai 2015. Deler av masteroppgaven ble presentert ved foredrag på Vintermøtet på Beitostølen 2015, arrangert av Norsk selskap for farmakologi og toksikologi.

Tusen takk til mine veiledere, professor Arild C. Rustan, professor G. Hege Thoresen og stipendiat Jenny Lund, for et kjempefint, spennende og veldig lærerikt år som avslutning på farmasistudiet. Spesielt takk til Arild C. Rustan for eksepsjonell oppfølging og engasjement gjennom hele perioden. Takk til G. Hege Thoresen for gode råd underveis og i skriveprosessen. Takk til Jenny Lund for god hjelp, veiledning og svar på alt jeg måtte lure på til enhver tid. Jeg vil også takke Camilla Stensrud for god opplæring på lab, Eili Tranheim Kase for hjelp i forbindelse med RNA-isolering og Yuan Zeng Feng for gode råd og korrekturlesing. Takk til alle i "Muskelbunten" for lærerike møter og råd underveis. Hele avdelingen i Gydas vei fortjener et stort takk for godt humør og et samhold som har gjort at jeg har trivdes så godt.

Takk til hele kull 2015 for en fin studietid, og spesielt takk til "Farmasijentene" for motivasjon og mange gode minner fra disse fem årene. Tusen takk til alle masterstudentene i Gydas vei for hyggelige lunsjer, mye latter og avsporinger underveis.

Tusen takk til venner og familie for oppmuntringer gjennom hele studieperioden. Spesielt takk til Nina Helle, mamma og pappa for all støtte og engasjement som har vært veldig viktig for meg. Sist, men ikke minst, tusen takk til Tor Otto Salvesen for uvurderlig motivasjon og støtte gjennom disse fem årene.

Oslo, mai 2015

Siw Anette Helle

Abstract

Background: Overweight and obesity may lead to ectopic lipid accumulation in metabolic tissues as for example skeletal muscle, as a consequence of exceeded storage capacity of adipose tissues. A high level of intramyocellular triacylglycerol (IMTG) is associated with insulin resistance in subjects with overweight and type 2 diabetes (T2D). Likewise, endurance trained athletes also show high levels of IMTG, but are still insulin sensitive. This phenomenon is known as the Athletes' paradox. To get further insight in the athletes' paradox and potentially mechanisms that regulate IMTG energy metabolism was studied in cultured skeletal muscle cells (myotubes) isolated from biopsies from young men categorized in an athlete (maximal oxygen consumption - $\text{VO}_{2\text{max}} > 60 \text{ ml/min/kg}$) and an untrained group ($\text{VO}_{2\text{max}} < 40 \text{ ml/min/kg}$), respectively.

Methods: Satellite cells were isolated from *musculus vastus lateralis*, activated to proliferating myoblasts and differentiated into multinuclear myotubes in culture. Donors were recruited into two groups dependent of their $\text{VO}_{2\text{max}}$ as explained above. Glucose and lipid metabolism were studied using substrate oxidation assay with radiolabeled D-[^{14}C]glucose and [1- ^{14}C]oleic acid, respectively. β -oxidation of oleic acid was measured by analyzing acid soluble metabolites (ASM) in the culture medium. To investigate metabolic flexibility of the cells glucose and oleic acid metabolism of myotubes were also measured after presence of unlabeled oleic acid and glucose, respectively. In some experiments myotubes were treated with the peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) δ agonist GW501516 or the liver X receptor (LXR) agonist Tularic (T0901317). In addition, cells were incubated with a mitochondrial uncoupler, carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazone (FCCP), to calculate the spare reserve capacity of fatty acids. Expression of genes important for cellular energy metabolism was measured using quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Fiber types were studied by immunohistochemistry of the biopsies and qPCR on the cultured myotubes.

Results: Myotubes from the athletes had higher oleic acid uptake after 28 hours, and showed higher oleic acid oxidation compared to myotubes from untrained subjects. Myotubes from athletes showed enhanced metabolic flexibility compared to myotubes from untrained with respect to oleic acid suppression (%) on oxidation of glucose. There was no significant

difference in oxidative reserve capacity of oleic acid between the groups. Uptake and oxidation of glucose were not different between myotubes from the athlete and untrained group. The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) δ -agonist GW501516 showed similar effect on fatty acid oxidation as endurance training in myotubes from both athletes and untrained, but had no additive effects. Myotubes from untrained individuals had greater response (%) of GW501516 on oleic acid uptake than trained individuals. The liver X receptor agonist Tularic stimulated the fatty acid metabolism in myotubes. In addition, Tularic tended to increase fatty acid accumulation in myotubes from untrained subjects, which was not the case for the athletes. There were no significant differences between the groups in mRNA expression of the genes that were studied; myosin heavy chain gene- β (MYH7), myosin heavy chain gene-2A (MYH2), "cluster of differentiation" 36 (CD36), carnitine palmitoyltransferase (CPT) 1a and 1b, cytochrome c-1 (CYC1), pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) 4 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α (PGC1 α), in myotubes. There was no significant correlation between expression of the fiber type composition *in vivo* and *in vitro*.

Conclusion: Myotubes from endurance trained individuals had higher fatty acid metabolism and increased metabolic flexibility compared to myotubes from untrained individuals, indicating that these mechanisms may be important for the athlete's paradox. More data from additional studies are required to fully understand underlying mechanisms of regular endurance exercise.

Sammendrag

Bakgrunn/mål: Overvekt og fedme medfører ektopisk fettakkumulering i metabolske vev som for eksempel skjelettmuskel, fordi fettvevets lagringskapasitet overskrides. Høye nivåer av intramyocellulære triacylglyseroler (IMTG) hos personer med overvekt og type 2-diabetes (T2D) er assosiert med insulinresistens. Utholdenhetstrenerne atleter har imidlertid også økte nivåer av IMTG, men er på tross av dette likevel insulinsensitive. Dette fenomenet er omtalt som atletparadokset. For å oppnå større forståelse for atletparadokset og mulige bakenforliggende mekanismer som regulerer IMTG ble energimetabolisme i differensierte skjelettmuskelceller (myotuber) isolert fra biopsier fra unge menn kategorisert i en atletgruppe (maksimalt oksygenopptak - $VO_{2\text{maks}} > 60 \text{ ml/min/kg}$) og en utrent gruppe ($VO_{2\text{maks}} < 40 \text{ ml/min/kg}$) undersøkt.

Metode: Satelittceller ble isolert fra *musculus vastus lateralis*, aktivert til prolifererende myoblaster i kultur og differensiert til flerkjernede myotuber. Donorene var rekruttert til to grupper med hensyn på $VO_{2\text{maks}}$ som angitt ovenfor. Glukose- og oljesyremetabolismen ble undersøkt med substratoksidasjonsmetoden og henholdsvis radiomerket D- $[^{14}\text{C}(\text{U})]$ glukose og $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre. β -oksidasjon av oljesyre ble bestemt ved analyse av syreløselige metabolitter (ASM) i cellekulturmediet. Glukose- og oljesyremetabolisme av myotubene ble også undersøkt ved tilstedeværelse av henholdsvis umerket oljesyre og glukose for å kunne undersøke metabolsk fleksibilitet av myotubene. Videre ble myotuber behandlet med peroksisomproliferator-aktivert reseptor (PPAR) δ -agonisten GW501516 eller lever-X-reseptor (LXR)-agonisten Tularik (T0901317). For å kunne beregne oksidativ reservekapasitet ble myotuber behandlet med en mitokondriell frikobler, karbonyl cyanid-4-(trifluorometoksy)-fenylhydrazon (FCCP). Ekspresjon av gener som er involvert i energimetabolisme ble målt ved qPCR. Fibertyper ble undersøkt ved immunhistokjemi på biopsiene og qPCR på de dyrkede myotubene.

Resultater: Myotuber fra atletgruppen viste høyere opptak av oljesyre etter 28 timer, og høyere oljesyreoksidasjon sammenlignet med myotuber fra utrentgruppen. Målt som oljesyresuppresjon (%) på glukoseoksidasjonen viste myotuber fra atletgruppen bedre metabolsk fleksibilitet sammenlignet med myotuber fra utrentgruppen. Det ble ikke funnet forskjell i oksidativ reservekapasitet av oljesyre for gruppene. Glukoseopptak og -oksidasjon

var ikke forskjellig mellom myotuber fra atlet- og utrentgruppen. Peroxisomproliferator-aktivert reseptor (PPAR) δ -agonisten GW501516 hadde lik effekt som utholdenhetstrening på fettsyreoksidasjon i myotuber fra både atleter og utrente, men ga ingen tilleggseffekter. Myotuber fra utrente individer viste imidlertid større respons (%) av GW-behandlingen på oljesyreopptaket enn fra godt trente individer. Lever-X-reseptor (LXR)-agonisten Tularik stimulerte fettsyremetabolismen i myotuber, og viste tendens til økt fettsyreakkumulering (CA) i myotuber hos utrente hvilket ikke var tilfellet for celler fra utholdenhetstrente individer. Det ble ikke gjort signifikante funn mellom gruppene med hensyn på mRNA-ekspressjon av genene som ble undersøkt i myotubene; myosin tungkjedegen- β (MYH7), myosin tungkjedegen-2A (MYH2), "cluster of differentiation" 36 (CD36), karnitin-palmitoyltransferase (CPT) 1a og 1b, cytokrom c-1 (CYC1), pyruvat dehydrogenase kinase (PDK) 4 og peroksisomproliferator-aktivert reseptor gamma koaktivator-1 α (PGC1 α). Videre ble det ikke funnet en signifikant sammenheng mellom fibertypefordelingen *in vivo* og *in vitro*.

Konklusjon: Myotuber fra utholdenhetstrente individer hadde høyere fettsyremetabolisme og høyere metabolsk fleksibilitet enn myotuber fra utrente individer, noe som kan indikere at disse mekanismene er av betydning for atletparadokset. Det trengs imidlertid ytterligere data fra videre studier for å kunne trekke sikre konklusjoner angående bakenforliggende mekanismer av regelmessig utholdenhetstrening.

Forkortelser

36B4	Syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0
ACC	Acetyl-CoA karboksylase
ADP	Adenosindifosfat
PKB	Proteinkinase B
AMP	Adenosinmonofosfat
AMPK	5'AMP-aktivert protein kinase
ASM	Syreløselige metabolitter
ATGL	Fettvevs triglycerol lipase
ATP	Adenosintrifosfat
BSA	Bovint serumalbumin
CA	Celleassosiert
CaMKII	Kalsium/kalmodulin-avhengig proteinkinase II
CD36	"Cluster of differentiation" 36
CGI-58	"Comparative gene identification"-58
CoA	Koenzym A
CPT	Karnitin-palmitoyltransferase
CYC1	Cytokrom c-1
DAG	Diasylglyserol
DMDM	"Dulbecco's Modified Eagle Medium"
DMSO	Dimetylsulfoksid
ETK	Elektrontransportkjeden
FABP _C	Fettsyrebindende protein i cytoplasma
FABP _{pm}	Fettsyrebindende protein i plasmamembranen
FADH ₂	Flavin adenin dinukleotid
FATP	Fettsyretransportprotein
FCCP	Karbonyl cyanid-4-(trifluorometoksy)fenylhydrazon
GAPDH	Glyseraldehyd 3-fosfatdehydrogenase
GLUT	Glukosetransportør
HbA _{1c}	Glykosylert hemoglobin A _{1c} (langtidsblodsukker)
HBSS	Hanks bufret saltløsning
HDL	"High-density" lipoprotein
HEPES	4-(2-hydroksyetyl)-1-piperazinetsulfonsyre

Forkortelser

HSL	Hormonsensitiv lipase
IDF	”The International diabetes federation”
IMTG	Intramyocellulære triacylglyseroler
IRS	Insulinreseptorsubstrat
LCFA	Langkjedet fettsyre
LD	Lipiddråper
LPL	Lipoprotein lipase
LXR	Lever-X-reseptor
MAPK	mitogenaktivert protein kinase
MEF2	Myocyt forsterkende faktor-2
MetS	Metabolsk syndrom
MHC	Myosintungkjede
mRNA	Messenger ribonukleinsyrer
MYH2	Myosin tungkjedegen-2A
MYH7	Myosin tungkjedegen- β
NADH ₂	Nikotinamid adenin dinukleotid
NaOH	Natriumhydroksid
OXPHOS	Oksidativ fosforylering
PBS	Fosfatbufret saltløsning
PDK	Pyruvat dehydrogenase kinase
PGC1 α	Peroksisomproliferator-aktivert reseptor gamma koaktivator 1- α
PI3K	Fosfatidylinositol-3-kinase
PKC	Proteinkinase C
PLIN	Perilipiner
PPAR	Peroksisomproliferator-aktivert reseptor
qPCR	Kvantitativ polymerasekjedereaksjon
REK	Regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk
RER	Respiratorisk utvekslingsforhold
ROS	Reaktive oksygenspesies
rpm	Rotasjoner per minutt
RXR	Retinoid-X-reseptor
SEM	Standardfeilen til gjennomsnittet
T2D	Type 2-diabetes
TAG	Triacylglyserol

Forkortelser

TCA	Trikarboksylsyresyklus
TTAcr-CoA	Tetradecyltioakryl-koenzym A
TTP	Tetradecyltiopropionsyre
VLDL	”Very low-density” lipoprotein
VO ₂ maks	Maksimalt oksygenopptak

Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	1
1.1	Skjelettmuskel	1
1.2	Fibertypefordeling i skjelettmuskel	2
1.2.1	Effekter av trening på fibertypesammensetning.....	2
1.2.2	Effekter av peroksisomproliferator-aktiverte reseptorer (PPAR) på fibertypesammensetningen	3
1.3	Energimetabolisme i skjelettmuskel	3
1.3.1	Glukosemetabolisme	4
1.3.2	Lipidmetabolisme	6
1.4	Trening og energimetabolisme.....	9
1.4.1	Substratutnyttelse ved trening	9
1.4.2	Mitokondriefunksjon.....	10
1.4.3	Intracellulært kalsiumnivå.....	11
1.4.4	5'AMP-aktivert protein kinase (AMPK)	11
1.4.5	Epigenetikk	13
1.5	Atletparadokset.....	14
1.6	Metabolsk fleksibilitet	17
1.7	Metabolske sykdommer	18
1.7.1	Overvekt og fedme.....	18
1.7.2	Insulinresistens.....	18
1.7.3	Metabolsk syndrom (MetS)	19
1.7.4	Type 2-diabetes (T2D).....	20
1.8	Trening som behandling ved metabolske sykdommer	20
1.9	Peroksisomproliferator-aktiverte reseptorer (PPAR).....	21
1.9.1	Klinisk bruk av PPAR-agonister.....	22
1.10	Lever-X-reseptorer (LXR).....	23
1.11	Tetradecyltiopropionsyre (TTP)	24
1.12	Hensikten med oppgaven	25
2	Materialer og metoder.....	26
2.1	Materialer.....	26
2.2	Cellekarakteristika	28
2.3	Cellebank	28
2.3.1	Oppskalering.....	29
2.3.2	Nedfrysing.....	29
2.4	Kollagencoating.....	30
2.5	Dyrking av skjelettmuskelceller	30
2.5.1	Utsåing	30
2.5.2	Proliferasjon og differensiering.....	31
2.5.3	Behandlinger av myotuber	31
2.6	Deteksjon av substratoksidasjon og -akkumulering.....	32
2.6.1	Substratoksidasjonsmetoden	32
2.6.2	Forsøksmedier.....	33
2.6.3	Analyse av syreløselige metabolitter.....	34
2.6.4	Celleassosiert radioaktivitet (CA)	34
2.6.5	Måling av protein ved hjelp av Bradfords metode.....	34
2.7	Kvantitativ polymerase-kjedereaksjon (qPCR)	35
2.7.1	Celledyrking og høsting til qPCR	35
2.7.2	Isolering av RNA	35
2.7.3	Spektrofotometrisk kvantifisering av RNA.....	36

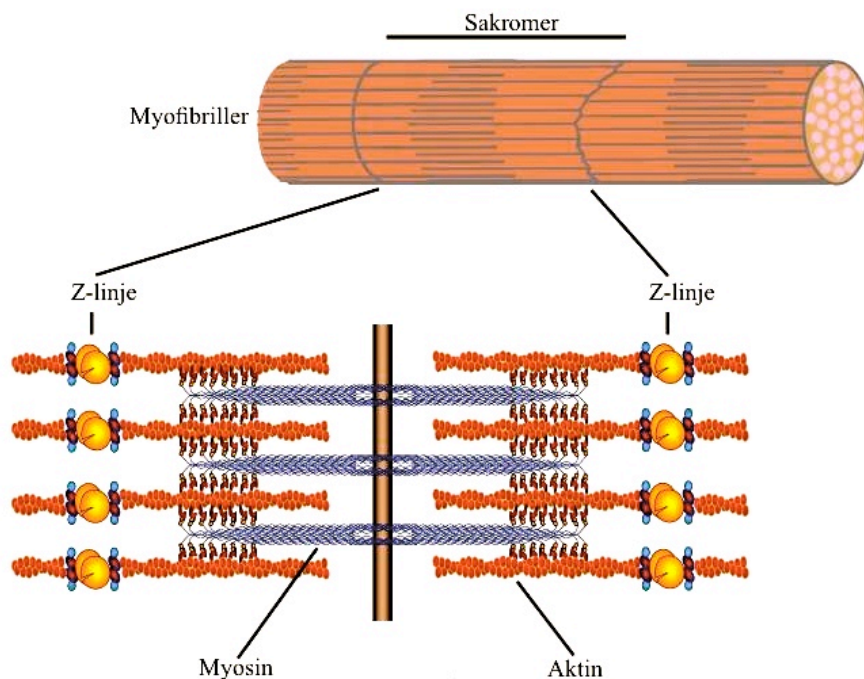
Innholdsfortegnelse

2.7.4	Syntese av cDNA	36
2.7.5	qPCR.....	37
2.7.6	Kvantifiserte gener	38
2.7.7	Primere benyttet til qPCR.....	39
2.8	Immunhistokjemi	39
2.9	Formler til beregninger av metabolismeparametere	40
2.10	Statistikk	41
3	Resultater.....	42
3.1	Kliniske data.....	42
3.1.1	Korrelasjoner mellom ulike <i>in vivo</i> -data.....	43
3.2	Celledyrking	44
3.3	Glukosemetabolisme i myotuber fra atletgruppen sammenlignet med myotuber fra utrentgruppen	45
3.4	Lipidmetabolisme i myotuber fra atletgruppen sammenlignet med myotuber fra utrentgruppen	45
3.5	Oksidativ reservekapasitet	48
3.6	Metabolsk fleksibilitet	49
3.6.1	Suppresjonseffekt av oljesyre på glukosemetabolismen	49
3.6.2	Suppresjonseffekter av glukose på oljesyremetabolismen	50
3.6.3	Adapterbarhet	51
3.6.4	Substratregulert fleksibilitet.....	51
3.7	Behandlingseffekter på skjelettmuskelceller	53
3.7.1	Effekter av PPAR δ -agonisten GW501516 på glukosemetabolismen	53
3.7.2	Effekter av PPAR δ -agonisten GW501516 på oljesyremetabolismen	54
3.7.3	Effekter av LXR-agonisten Tularik (T0901317) på oljesyre-metabolismen	56
3.7.4	Effekter av 4-tiafettsyreanalogen tetradecyltiopropionsyre (TTP)	58
3.8	mRNA-ekspresjon av gener	62
3.9	Fibertypefordeling og korrelasjoner	64
3.10	Korrelasjoner mellom <i>in vivo</i> - og <i>in vitro</i> -data	66
3.11	<i>In vitro</i> - <i>in vitro</i> -korrelasjoner	67
4	Diskusjon.....	70
4.1	Vurdering av atlet-studien	70
4.2	Vurdering av metodene i studien.....	72
4.3	Glukosemetabolisme	74
4.4	Oljesyremetabolisme	75
4.5	Metabolsk fleksibilitet	80
4.6	Effekter på energimetabolismen i myotuber etter behandling med tetradecyltiopropionsyre (TTP).....	82
4.7	Fibertypefordeling i skjelettmuskel	85
4.8	<i>In vivo-in vitro</i> -korrelasjonsvurderinger	86
4.9	Veien videre.....	87
5	Konklusjon.....	88
	Litteraturliste	89
	Appendiks	96

1 Innledning

1.1 Skjelettmuskel

Skjelettmuskel er et viktig organ i omsetningen av glukose og fettsyrer til energiutnyttelse, og er videre et meget fleksibelt organ som regulerer energiforbruket avhengig av metabolske forhold [1]. Muskelfibrene i skjelettmuskel er oppbygd av myofibriller som består av flere sakromere som forbinder hverandre i såkalte Z-linjer. Sakromeren består av to kontraktile elementer, myosin (tykke filamenter) og aktin (tynne filamenter), i en anordning, som betegnes av tverrstripet muskulatur (figur 1.1) [2]. Adenosintrifosfat (ATP) kan bindes til myosin og videre spaltes til adenosindifosfat (ADP), og dette medierer energi til muskelkontraksjon [3]. Denne spaltingen danner grunnlaget for kontraksjonsmekanismen hvor myosin og aktin delvis overlapper hverandre slik at sakromeren forkortes avhengig av kontraksjonskraften [2]. Kontraksjonen av skjelettmuskelen reguleres av det somatisk motoriske nervesystemet som følge av aksjonspotensialer og frigjøring av Ca^{2+} [2], og er avhengig av hvor raskt myosin kan spalte ATP [3]. Human skjelettmuskel har intramyocellulære lipidlagre av blant annet glyserolipider, fosfolipider, sphingolipider og kolesterolistere, som alle kan kommunisere med myocytter (skjelettmuskelceller), og videre innvirke på celledfunksjonen [4].



Figur 1.1: Kontraksjonsmekanismen i skjelettmuskulatur. Myofibriller består av sakromerenheter forbundet i såkalte Z-linjer. Ved muskelkontraksjon forskyves aktinfilamentene mot hverandre som følge av at myosin spalter ATP til ADP, og sakromeren mellom Z-linjene forkortes. ADP, adenosindifosfat; ATP; adenosintrifosfat. Figuren er modifisert fra [2].

1.2 Fibertypefordeling i skjelettmuskel

Det uttrykkes tre ulike isoformer av myosintungkjeder (MHC) i humane skjelettmuskelfibre: MHC- β (type 1-fibre), MHC-2A (type 2A-fibre) og MHC-2X (type 2X-fibre) [5]. Muskelfibrene er inndelt både etter hvor hurtig ATP-spaltingen foregår og hvordan ATP-produksjonen foregår. Type 1-fibre har langsomme kontraksjoner mens type 2-fibre har hurtige kontraksjoner. Videre er type 1-fibre oksidative fordi de danner ATP ved oksidativ fosforylering (OXPHOS) [5]. Dette er sikret ved at disse består av større andel mitokondrier sammenlignet med type 2-fibre, [6] og resulterer også i at type 1-fibre er de mest utholdne av fibertypene. Type 2A er raske oksidative fibre, mens type 2X er raske glykolytiske fibre [5, 7], hvilket resulterer i at type 2-fibre dominerer ved kortvarig og intensiv aktivitet, mens type 1-fibre dominerer ved moderat intensitet. Vanligvis er alle de tre isoformene av MHC uttrykt i human skjelettmuskel [5], men i varierende grad. Prosentandel oksidative fibre er rapportert å være omtrent 55 % i *musculus vastus lateralis* hos utrente personer [8]. Type 1-fibre har vist større evne til å både ta opp og oksidere fettsyrer, og har i tillegg vist seg å være mer insulinsensitive, men det er imidlertid flere faktorer av betydning for disse parameterne, som for eksempel trening [6, 9]. Motonevroner danner nerveforbindeleser med skjelettmuskel (innervering), og det er vist at henholdsvis ”raske”- og ”langsomme”-motonevroner innnerverer oksidative og glykolytiske fibertyper. På tross av at disse mekanismene ikke er fullstendig klarlagte, er det vist i rottemodell at endret innervering av skjelettmuskel spesifiserer fibertype avhengig av dette [10]. Aktivisering av spesifikke transkripsjonsfaktorer gjennom Ras-mitogenaktivert protein kinase (MAPK)/ ekstracellulær signalregulert kinase-signalveier er en hypotetisk mekanisme for fibertypespesifisering [11]. Ved oppregulering av MAPK-aktivitet i skjelettmuskel fra rotte er det vist økt uttrykk av en spesifikk promotor for langsomme muskelfibre, og det er foreslått at Ras derved bidrar til differensiering til langsomme muskelfibre [11]. Fibertypefordeling av skjelettmuskel er foreslått å være påvirket av metabolske sykdommer som blant annet fedme og type 2-diabetes (T2D) [12].

1.2.1 Effekter av trening på fibertypesammensetning

Skjelettmuskel er et meget plastisk organ, men det foreligger usikkerhet angående konvertering til annen fibertype som følge av trening [13, 14]. På den annen side er slike studier ofte av relativ kort varighet. Fenotype av fibertype i skjelettmuskel er assosiert med uttrykk av MHC-isoformer [5], og det er tenkt at trening kan påvirke fenotypen i større grad enn genotypen av skjelettmuskel. Skjelettmuskel ser ut til å ha større evne til å endre fibertype

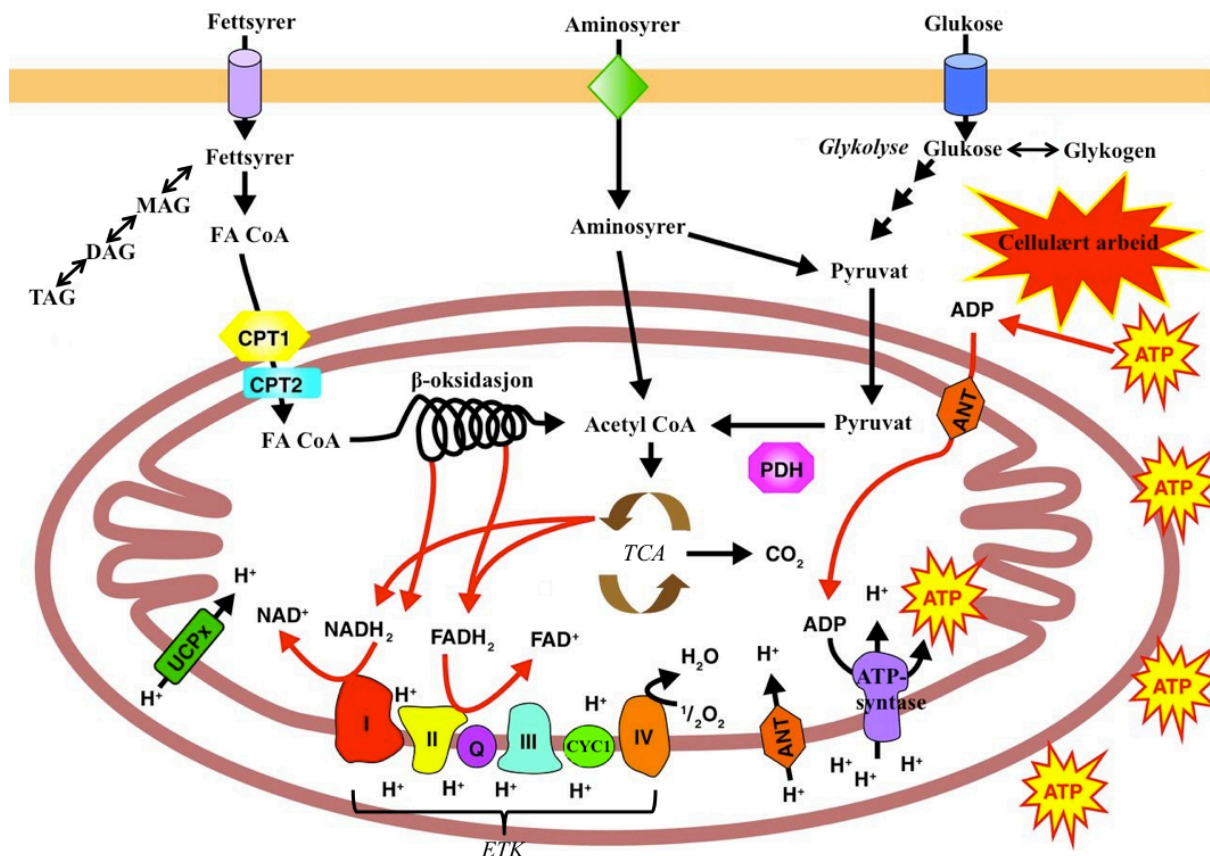
fra 2A til 2B, enn å konvertere fra type 1 til type 2 [15]. En hypotese er at trening endrer fiberegenskapene, og spesialisere disse via en kalsiumsignaleringsvei, som blant annet involverer peroksisomproliferator-aktivert reseptor gamma koaktivator 1- α (PGC1 α) [12].

1.2.2 Effekter av peroksisomproliferator-aktiverede reseptorer (PPAR) på fibertypesammensetningen

Peroksisomproliferator-aktiverede reseptorer (PPAR) er kjernereseptorer (transkripsjonsfaktorer) med innvirkning på gentranskripsjon (se avsnitt 1.9). En potensiell effekt av PPAR er innvirkning på fibertypen i skjelettmuskelen, og det er foreslått at regulering av PGC1 α -genekspresjon, som er en kofaktor for reseptoren, har en viktig rolle [12]. PPAR-stimulering viste høyere andel av oksidative fibre i både utrente og trente mus [16]. Oksidative type 1-fibre har vist høyere genuttrykk av PPAR og PGC1 α sammenlignet med glykolytiske type 2-fibre, og på bakgrunn av at type 1-fibre også i større grad er rapportert å være insulinsensitive [17] kan økt forståelse av disse mekanismene bidra til potensielle nye legemiddelmål for bedret insulinsensitivitet.

1.3 Energimetabolisme i skjelettmuskel

For å opprettholde de biologiske cellulære prosessene er cellene avhengige av energitilførsel (ATP), og denne energien kan utvinnes fra glukose, fettsyrer og aminosyrer (figur 1.2). Som beskrevet i avsnitt 1.3.1 og 1.3.2 utvinnes energien vanligvis gjennom nedbrytning av glukose og fettsyrer. Karbohydrater og lipider brytes ned til henholdsvis glukose og fettsyrer som til slutt blir oksidert til CO₂ og H₂O. Denne prosessen utvinner energi som lagres i energibæremolekyler som nikotinamid adenin dinukleotid (NADH₂) og flavin adenin dinukleotid (FADH₂), og resulterer i dannelsen av ATP. Ved situasjoner som faste og vedvarende trening der tilførselen av glukose ikke er tilstrekkelig for glukosebehovet, benyttes pyruvat, laktat eller aminosyrer til syntese av glukose gjennom glukoneogenesen. Denne reaksjonen forekommer i størst grad i leverceller, og er svært energikrevende [18].

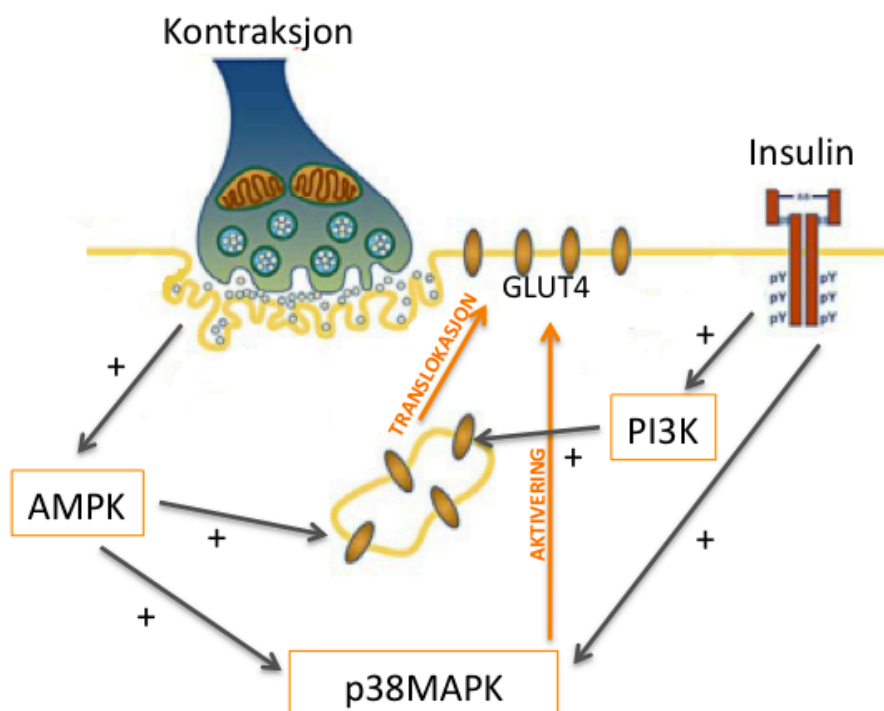


Figur 1.2: Energimetabolisme i skjelettmuskel. Monosakkarider, fettsyrer og aminosyrer utvinnes fra maten som fordøyes til dannelse av energi gjennom TCA, OXPHOS og ETK. Bæremolekylene $NADH_2$ og $FADH_2$ frigjør sine elektroner som overføres i ETK gjennom fler enzymer (kompleks I-IV), og dette medierer en protongradient. Energien som utvinnes fra protonoverføringene benyttes til å drive ATPasen til omdanning av ADP til ATP. I-IV, kompleks I-IV i ETK; ANT, Adenin nukleotid reseptor; ADP, adenosindifosfat; ATP, adenosintrifosfat; CPT, karnitin-palmitoyltransferase; CYC1, cytokrom c-1; DAG, diacylglycerol; ETK, elektrontransportkjeden; FA CoA, fettsyre koenzym A; FAD^+ , flavinadenindinukleotid - oksidert; $FADH_2$, flavinadenindinukleotid - redusert; H^+ , proton; MAG, monoacylglycerol; NAD^+ , nikotinamid-adenin-dinukleotid - oksidert; $NADH_2$, nikotinamid-adenin-dinukleotid - redusert; OXPHOS, oksidativ fosforylering; PDH, pyruvat dehydrogenase; TAG, triacylglycerol; TCA, trikarboksylsyresyklus; UCPX, frikoblerproteiner. Figur modifisert fra [6].

1.3.1 Glukosemetabolisme

Skjelettmuskel har en hovedoppgave i å regulere blodglukose *in vivo* som følge av insulinstimulering etter et måltid samt under fysisk aktivitet. Glukosetransport inn i cellen forekommer via passiv diffusjon via spesifikke glukosetransportører (GLUT). Det er identifisert 15 ulike GLUT-proteiner, hvorav fem av disse er uttrykt i human skjelettmuskel (GLUT1, 4, 5, 8 og 11) [19]. GLUT4 er imidlertid det høyst forekommende GLUT-proteinet i human skjelettmuskel [20]. Insulin- og kontraksjonsstimulert glukoseopptak medieres av GLUT4, mens glukoseopptak under basale betingelser (faste og hvile) i størst grad er mediert av GLUT1 [20]. Både muskelkontraksjon og insulinsignaler medierer translokasjon av GLUT4 fra intracellulære vesikler til cellemembranen (figur 1.3), og dette er det

hastighetsbestemmende trinnet i glukosemetabolismen [21]. Muskelkontraksjon aktiverer 5'-AMP-aktivert proteinkinase (AMPK - beskrevet i avsnitt 1.4.4), mens insulin medfører GLUT4 translokasjon via en kompleks signaleringskaskade som involverer både fosfatidylinositol-3-kinase (PI3K) og proto-oncoprotein c-Cbl. p38MAPK medfører GLUT4 aktivering på celleoverflaten som en respons av både kontraksjon og insulin (figur 1.3) [19].



Figur 1.3: Translokasjon av GLUT4. Glukose tas opp av cellen som følge av at GLUT4 translokeres til celleoverflaten som respons på stimuli av insulin og muskelkontraksjon. AMPK, PI3K og p38MAPK bidrar i mekanismen bak translokasjon og aktivering. AMPK, 5'-AMP-aktivert proteinkinase; GLUT4, glukosetransportør-4; MAPK, mitogenaktivert protein kinase; PI3K, fosfatidylinositol-3-kinase. Figur modifisert fra [19].

Som en respons på økning i plasmaglukose bindes insulin til α -subenheten hvilket medfører autofosforylering av reseptorens β -subenhet som videre aktiverer sin intrinsiske tyrosinkinaseaktivitet på intracellulære substrater. Hovedsakelig er det insulinreseptor-substrater (IRS) som aktiveres, og aktivering av IRS-1 er i størst grad årsak til insulinstimulert glukosetransport i skjelettmuskel [19]. IRS fungerer som bindingssete for proteiner med Src homologe 2-domener. Den regulatoriske p85-subenheten av PI3K er et eksempel på et slikt protein, og ved binding vil IRS-1 eller IRS-2 aktivere den katalytiske p110-subenheten av PI3K. Dette er en lipid-kinase som danner 3'-fosfoinositider, og disse katalytiske produktene er avgjørende for aktivering av fosfoinositidavhengige kinaser som inngår i pyruvatdehydrogenase-komplekset (PDC) som danner acetyl-koenzym A (CoA) fra pyruvat [19]. Pyruvatdehydrogenase kinase (PDK) som forekommer i fire isoenzymer (PDK 1-4) [17]

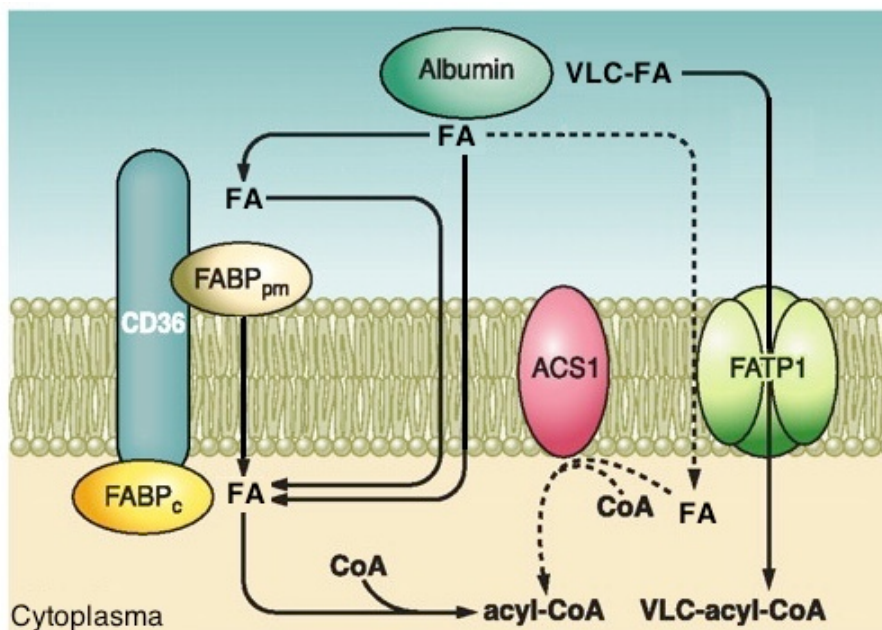
regulerer aktiviteten av PDC. PDK1 og -2 aktiverer protein kinase B (PKB), også kalt Akt, til mediering av GLUT4-translokasjon [19]. PDK4 inhiberer imidlertid PDC, hvilket resulterer i redusert oksidasjon av karbohydrater og stimulering av fettsyreoksidasjonen i skjelettmuskel [17].

Etter å ha blitt tatt opp i cellen kan glukose enten undergå glykolysen til dannelsen av to molekyler pyruvat, eller bli lagret i form av glykogen i glykogensyntesen. Lageret av glykogen bygges opp og brytes ned avhengig av de metabolske forholdene, og stimuleres blant annet av insulin [18]. Ved lav tilgang på oksygen (anaerob tilstand) kan pyruvat omdannes til laktat i cytoplasma, og videre undergå glukoneogenesen i lever til dannelsen av glukose. Ved god tilgang på oksygen (aerob tilstand) tas pyruvat opp av mitokondriene, og to molekyler av pyruvat omdannes til to acetyl-CoA-molekyler og to NADH_2 . NADH_2 forbrukes i reaksjonen med OXPHOS, mens acetyl-CoA videre kan omdannes til citrat og utnyttes i lipogenesen til biosyntese av fettsyrer og triacylglycerol (TAG). En andre mulighet er at acetyl-CoA overføres til trikarboksylsyresyklus (TCA), også kalt Krebs syklus eller sitronsyresyklus. Gjennom TCA frigjøres CO_2 , NADH_2 og FADH_2 , før reaksjonen fortsetter gjennom OXPHOS som er det siste trinnet i glukose- og fettsyremetabolismen. Bæremolekylene NADH_2 og FADH_2 som dannes i OXPHOS, overfører sine elektroner til elektrontransportkjeden (ETK) gjennom fire enzyrbærerkomplekser (kompleks I-IV), og elektronoverføringen i ETK er favorisert ved at elektronene mister energi fordi energi frigjøres ved elektronoverføringer mellom kompleksene. Cytokrom c-1 (CYC1) mottar elektroner fra kompleks III og overfører disse til kompleks IV som reduserer oksygen til vann som følge av kobling av elektroner og protoner (illustrert i figur 1.2). Dette medierer en protongradient som frakter protoner inn til matriks igjen, og energien som utvinnes benyttes til å drive ATPasen til omdanning av ADP til ATP. Protoner kan også krysse innermembranen via adenin nukleotid reseptor og frikoblerproteiner som illustrert i figur 1.2, og dette medfører i likhet med ATP-syntese til reduksjon av protongradienten [6, 18].

1.3.2 Lipidmetabolisme

Lipider, lagret som TAG i fettvev og mobilisert som frie fettsyrer i plasma, er hovedenergikilden til menneskekroppen. Lipider tilført fra kosten, hvilket hovedsakelig er TAG, brytes ned av lipaser til spaltningsproduktene glyserol og fettsyrer. Hormonsensitiv lipase (HSL) medierer i størst grad nedbrytningen av diacylglycerol (DAG), mens fettvevs triacylglycerol lipase (ATGL) medierer nedbrytning av TAG [22]. I postabsorptiv fase er

lipolysereguleringen i fettvevet bestemmende for sirkulerende konsentrasjoner av fettsyrer fordi bare endogene fettsyrer kan nå sirkulasjonen [23]. I leveren reforestres fettsyrene, og pakkes sammen med proteiner og fosfolipider til dannelse av lipoproteiner, som fraktes rundt i sirkulasjonssystemet. På bakgrunn av pakningsstrukturen har lipoproteiner en hydrofob kjerne og en hydrofil overflate. Avhengig av apoprotein og mengde lipider i kjernen, er lipoproteiner inndelt i fire hovedgrupper: Kylomikroner med lavest tetthet, "very low-density" lipoprotein (VLDL), "low-density" lipoprotein (LDL) og "high-density" lipoprotein (HDL) med høyest tetthet, der hver enkelt har en spesifikk rolle i transporten av lipider [23, 24]. Kylomikronene når sirkulasjonssystemet via lymfesystemet, og lipidkjernen spaltes da av enzymet lipoprotein lipase (LPL) til fettsyrer som videre tas opp i vev. Fettsyrer tas spesielt opp i skjelettmuskler, lever, hjertet og fettvev som har endotelceller anriket av LPL. I fettvev skjer hovedsaklig reforesting av fettsyrer til lagring som TAG, mens hjerte, skjelettmuskel og lever er hovedorgan for fettsyreoksidasjon. Ved overskudd av fettsyrer lagres fettsyrer intracellulært i disse vevene [23]. I skjelettmuskel skjer lagring blant annet i form av intramyocellulære triacylglyseroler (IMTG), men det foreligger usikkerhet om bakenforliggende mekanismer og følger av dette (se avsnitt 1.5) [25, 26]. Lave glukosenivåer fører til at leveren bistår med oksidasjon av fettsyrer til dannelse av ketonlegemer, som videre kan oksideres av skjelettmusklene og hjernen [23]. Fettsyrer transporteres inn i cellen via passiv diffusjon eller ved hjelp av transportproteiner som vist i figur 1.4. Langkjedet fettsyrer (LCFA) er imidlertid avhengige av aktiv transport. Tilstedeværelse av proteiner som kan bindes til fettsyrer (for eksempel albumin) øker vannløseligheten, og kan videre påvirke fettsyrekonsentrasjonen i plasma. Opptak av fettsyrer til skjelettmuskelceller medieres av fettsyretransportører som "cluster of differentiation" 36 (CD36) og fettsyretransportprotein (FATP) 1 og 4. I tillegg bidrar fettsyrebindende protein i cytoplasma (FABP_c), som fungerer som en intracellulær buffer for fettsyrer, og fettsyrebindende protein i plasmamembranen (FABP_{pm}) til transport av fettsyrer [23, 27, 28]. CD36 har en sentral rolle blant fettsyretransportørene da denne, sammen med FATP4, er den mest effektive transportøren *in vivo*. I tillegg spiller CD36 og FABP_{pm} viktige roller for fettsyreoksidasjon *in vivo* [4, 28]. CD36 er også tilstede intracellulært, og kan translokere til cellemembranen og fremme fettsyreopptak. Mekanismen for dette er imidlertid uklar, men kan tenkes å være lignende GLUT4 translokasjon, og både insulinstimuli og kontraksjon fremmer translokasjon av CD36 til mediering av økt fettsyreopptak [28].



Figur 1.4: Opptak av fettsyrer over plasmamembranen. Før fettsyrer kan oksideres til utvinning av energi må de nå inn i cytosol. Dette skjer via passiv diffusjon eller som følge av aktiv transport via fettsyretransportører som FABP_{pm}, FATP og CD36. VLC-FA > 22C må transporteres fortrinnsvis via transportproteiner for å passere membranen, og forestrer direkte til VLC-acyl-CoA. Ekstra- og intracellulære fettsyre-bindende proteiner som Albumin og FABP_c bidrar til å øke vannløselighet av FA og fungerer som fettsyrebuffer. ACS1, acyl-CoA syntetase; CD36, "cluster of differentiation" 36; FA, fettsyre; FATP, fettsyretransportprotein; FABP_c, fettsyrebindende protein i cytoplasma; FABP_{pm}, fettsyrebindende protein i plasmamembranen; VLC, veldig lang kjedet; Figur modifisert fra [28].

Etter at fettsyrene er transportert inn i cytosol medfører acyl-CoA-syntase forestring av frie fettsyrer til acyl-CoA som da videre kan fraktes gjennom mitokondriemembranen. Karnitin-palmitoyltransferase (CPT) 1 og 2 har sentrale roller i denne transporten ved å danne langkjedede acylkarnitiner, som i bytte mot fritt karnitin, kan entre mitokondriene [6, 23].

Blant annet PPAR er involvert i regulering av genuttrykk av CPT1 [29, 30]. I mitokondriene spaltes acetyl-CoA av fettsyreesteren, og energi produseres som følge av β -oksidasjon av fettsyrer i tillegg til oksidasjon av acetyl-CoA i TCA til syntese av ATP via OXPHOS og ETK [23]. Prosessene er tidligere beskrevet for glukosemetabolismen i avsnitt 1.3.1.

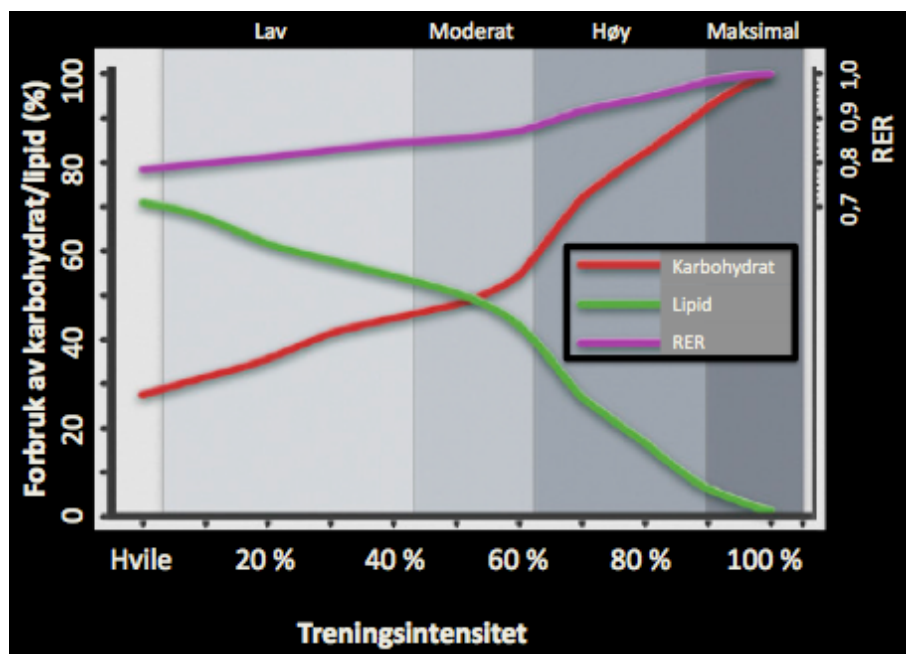
TAG bidrar til dannelse av intracellulære lipiddråper (LD) som kan lagre lipider og fungere som et reserve for energi [31]. I de senere årene er det blitt større interesse for LD og deres funksjoner fordi de er tenkt å ha en sentral rolle i lipidmetabolismen samt i energihomeostasen til cellene [32]. Disse dynamiske cellulære organellene er i kontakt med både mitokondriene og endoplasmatiske retikulum hvor det i stor grad foregår syntese av TAG, da kontaktpunktet er anrikt av acyl-CoA.

1.4 Trening og energimetabolisme

Kontraksjon påvirker i stor grad energimetabolismen i skjelettmuskelceller, og har en sentral rolle i regulering av cellulære signaler som kontrollerer mitokondriell biogenese og genuttrykk. Skjelettmuskel har en formidabel evne til å endre fenotype som respons på muskelkontraksjon. Disse endringene er reflektert ved endringer i metabolismeregulering, mitokondriefunksjon, transkripsjonsresponser og intracellulær signalering [21, 25, 26, 33-36]. I tillegg er endringer i kontraksjonsmekanisme sentralt, herunder endret proteinuttrykk og enzymaktivitet blant annet gjennom epigenetiske endringer [37].

1.4.1 Substratutnyttelse ved trening

Substratutnyttelse i skjelettmuskel i løpet av en treningsperiode avhenger av type aktivitet, varighet og intensitet [22].



Figur 1.5: Substratutnyttelse under en treningsperiode avhenger av treningsintensitet. Forbruk av fettsyrer reduseres av økt treningsintensitet, mens utnyttelse av glukose øker. Dette gjenspeiles av RER-verdien, som sier noe om i hvilken grad glukose og fettsyrer benyttes av skjelettmuskelen til ATP-dannelse. Ved RER-verdier opp mot en er glukose kilden til energi. ATP, adenosinmonofosfat; RER; respiratorisk utvekslingsforhold. Figur modifisert fra [38].

I tillegg er faktorer som næringsstatus, alder og kroppsbygning av betydning. Enzymkapasitet, metabolsk fleksibilitet og metabolismekapasitet av skjelettmuskel er også avgjørende for substratutnyttelsen. Energikildene som forbrukes ved trening med lav-moderat intensitet er hovedsakelig glukose utnyttet fra oralt inntak eller via glukoneogenese i lever, i

tillegg til fettsyrer frigjort fra fettvev gjennom lipolyse [22]. Ved økende intensitet brytes musklens glykogenlager ned, og utnyttelsen av sirkulerende glukose dominerer. Ved trening > 60 minutter dominerer utnyttelsen av fettsyreoksidering mens glykogenutnyttelsen reduseres, mens ved langvarig trening > 90 minutter med moderat intensitet fungerer IMTG som en viktig energikilde. Balansen mellom lipolyse og reforestring av intracellulære fettsyrer bestemmer til enhver tid nivået av IMTG [22]. Nedbrytning av IMTG er ikke fullstendig klarlagt, men skjer hovedsakelig som følge av lipaseaktivitet av ATGL og HSL i skjelettmuskel [38] som beskrevet i avsnitt 1.5.

1.4.2 Mitokondriefunksjon

Utholdenhetstrening fører til at mitokondriene øker sin kapasitet for ATP-syntese [25], og det er rapportert at mitokondriene øker i både størrelse og antall, i tillegg til å endre sammensetning og genekspresjon [38-40]. Dette er foreslått å være av betydning for økt aktivitet av proteiner involvert i mitokondriell produksjon av ATP og TCA-aktivitet, i tillegg til mobilisering, transport og oksidasjon av fettsyrer [38]. På bakgrunn av disse mekanismene kan trening ha gunstig påvirkning på mitokondriene i skjelettmuskelen. Mitokondriene er hovedkilde for reaktive oksygensubstanser, og lipider som akkumuleres i nærheten av mitokondriene er dermed utsatt for peroksidering som videre kan medføre lipotoksisitet [41]. I tillegg har *in vitro*- og *in vivo*-studier der forsøkspersonene er satt på høyfettdiett vist økt produksjon av reaktive oksygenspesies (ROS) i mitokondrier i skjelettmuskel. Dette er assosiert med insulinresistens, men den underliggende mekanismen er uklar. ROS er foreslått å interferere med insulinsignaleren ved aktivering av Ser/Thr kinaser [6]. Som følge av trening sees større antioksidantkapasitet i mitokondriene [38], og kan derfor potensielt beskytte mitokondriefunksjonen. I tillegg medfører muskelkontraksjon større kapasitet for både glukosetransport og glykogensyntese i skjelettmuskelcellene. Disse nevnte endringene i egenskapene av mitokondriene sees for alle de tre fibertypene, men effektene synes å være størst i fibertype 2A sammenlignet med type 1- og type 2X-fibre [38]. Utholdenhetstrening påvirker mitokondriene til å i større grad favorisere lipider fremfor karbohydrater til utnyttelse av energi, hvilket reduserer laktatdannelse og lipidakkumulering i skjelettmuskel [39]. Det er videre rapportert tendens til at utholdenhetstrening øker oksidativ reservekapasitet av mitokondrien [26], hvilket potensielt medierer større kapasitet for substratoksidasjon. Oksidativ reservekapasitet er differansen mellom maksimal- og basal oksidasjon. Til å beregne maksimal oksidativ kapasitet av myotuber benyttes en mitokondriell

frikobler, for eksempel karbonyl cyanid-4-(trifluorometoksy)fenylhydrazone (FCCP). Denne reduserer protongradienten som drives av elektrontransport over membranen og som benyttes av cellen til å drive reaksjonen fra ADP til ATP (som beskrevet i 1.3.1). Fordi FCCP bryter koblingen mellom ETK og fosforylering av ATP blir verken ETK eller ATP-syntasen påvirket, og elektrontransporten fortsetter uten at ATP blir dannet [6, 42].

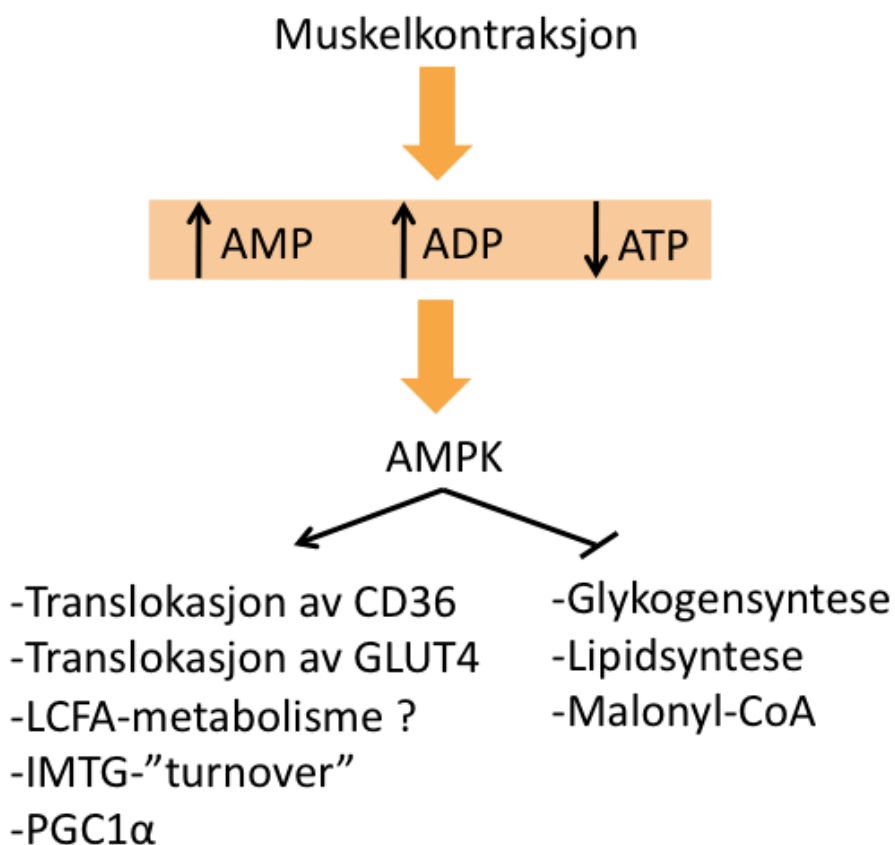
1.4.3 Intracellulært kalsiumnivå

Kalsium/kalmodulin-avhengig proteinkinase II (CaMKII) aktiveres ved høye nivåer av Ca^{2+} som en følge av muskelkontraksjon. CaMKII fosforylerer transkripsjonsfaktoren histon deacetylase 4, og hindrer da undertrykkelse av myocyt forsterkende faktor-2 (MEF2). Dette øker transkripsjon av MEF2-målgen som PGC1 α og GLUT4. På denne måten påvirker Ca^{2+} og CaMKII plastisitet av skjelettmuskel ved å regulere glukosetransport, fetttsyreopptak og -oksidasjon [38, 43]. β -adrenergt stimuli i tillegg til økte nivåer av Ca^{2+} er effekter av trening som kan påvirke både HSL og hastigheten av lipolyse blant annet via protein kinase C (PKC) [22]. Videre er det også foreslått at Ca^{2+} er et viktig signal for oppregulering av flere mitokondrielle gener som for eksempel PGC1 α via PKC [39]. På den annen side medieres trolig treningsinduserte effekter på skjelettmuskel som følge av et komplekst samspill som inkluderer økte nivåer av Ca^{2+} i tillegg til andre faktorer som for eksempel AMPK (se avsnitt 1.4.4).

1.4.4 5'AMP-aktivert protein kinase (AMPK)

Som følge av høyt energiforbruk ved trening øker nivået av adenosinmonofosfat (AMP) i større grad enn ATP i cellen, og medfører at AMP bindes til AMPK [44]. Denne mekanismen er ansett for å være viktigst i forbindelse med AMPK-aktivering ved muskelarbeid. AMPK fungerer som en energisensor i cellen, og aktivering fremmer katabolske prosesser som har flere effekter av betydning for energimetabolismen i skjelettmuskelen. AMPK fosforylerer blant annet Rab-GAP proteiner slik at fusjon av intracellulære GLUT4-vesikler til LD hindres, og på denne måten aktiveres GLUT4-mediert glukoseopptak i muskel. I tillegg reduserer AMPK glykogensyntesen i skjelettmuskel som en følge av inaktivering av glykogen syntase-1 [44, 45]. Glykogenlagre i skjelettmuskel er imidlertid antatt å være en regulator av AMPK ved å interferere med signaleringen, trolig gjennom en indirekte mekanisme [44]. AMPK inaktiverer acetyl-CoA karboksylase (ACC) 1 og glyserol fosfat acyl transferase hvilket medfører redusert syntese av fettsyrer, triacylglyseroler og fosfolipider [45]. Videre er

det foreslått at AMPK stimulerer fetttsyreopptaket ved å mediere translokasjon av fetttsyretransportøren CD36 [27]. Via fosforylering av HSL, som bidrar i nedbrytning av IMTG, er AMPK antatt å være viktig for reguleringen av IMTG-omsetningen ("turnover") [44]. Denne mekanismen kan potensielt være av betydning for atletparadokset (se avsnitt 1.5). I tillegg medierer AMPK fosforylering av flere transkripsjonsfatorer som er sentrale for regulering av viktige gener involvert i mitokondriell biogenese (for eksempel PGC1 α) [45]. AMPK stimulerer fetttsyreoksidasjonen ved fosforylering og inaktivering av ACC2, hvilket reduserer nivået av malonyl-CoA som er begrensende for fetttsyreoksidasjonen [45, 46]. Videre er det foreslått at AMPK bidrar til økt opptak og oksidasjon av LCFA, men denne mekanismen er uklar [44]. AMPK-aktivering har også effekter i andre vev enn skjelettmuskel som påvirker energimetabolismen; I lever nedreguleres glukoneogenese, mens i fettvev reduseres lipolyse som følge av AMPK-aktivering [45].



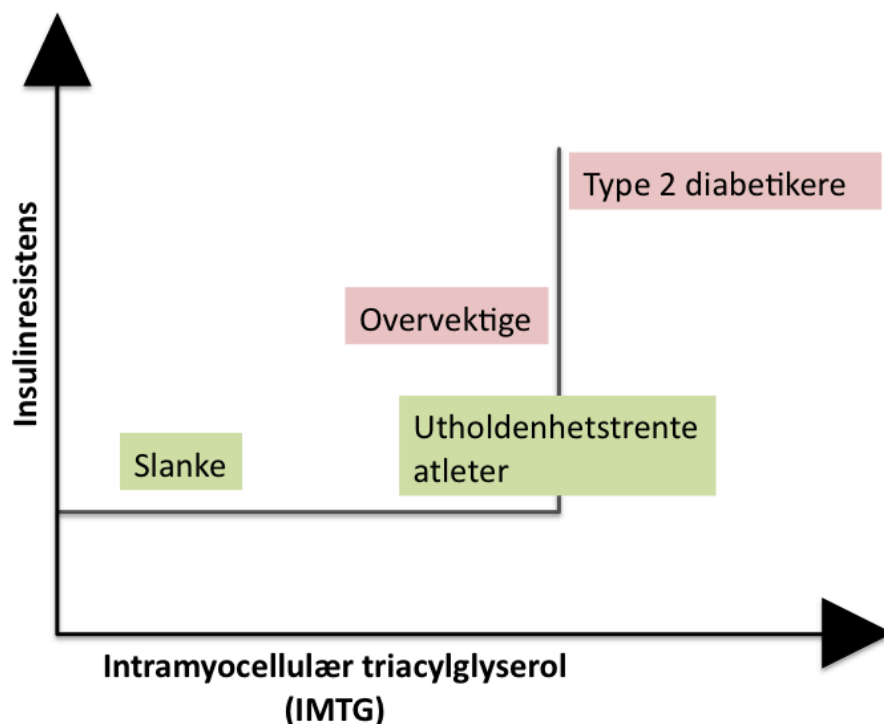
Figur 1.6: Metabolske effekter av AMPK. AMPK stimulerer katabolske prosesser og inhiberer energikrevende prosesser. ADP, adenosindifosfat ; AMP, adenosinmonofosfat ; AMPK, 5'AMP-aktivert protein kinase; APT, adenosintrifosfat, CD36, "cluster of differentiation" 36; GLUT4, glukosetransportør 4; IMTG, intramyocellulære triacylglyseroler; LCFA, langkjedet fetttsyre; PGC1 α , peroksisomproliferator-aktivert reseptor gamma koaktivator 1- α .

1.4.5 Epigenetikk

Epigenetikk er endringer i genfunksjonen som ikke kan forklares av endringer i DNA-sekvensen. DNA-metylering og histon-modifisering er to hovedmekanismer innen dette feltet [47]. Dette innebærer at celler med identisk DNA kan ha ulike fenotyper. Effekt av trening på epigenetikk er ikke fullstendig klarlagt, men det er vist redusert metylering av MEF2A, en transkripsjonsfaktor involvert i treningsindusert regulering av GLUT4, etter en treningsintervensjon [48]. Dette viser at treningseffekter kan mediere epigenetiske endringer av betydning for energimetabolismen. DNA-metylering kan begrense gentranskripsjon ved å allosterisk hindre binding til transkripsjonsfaktorer og transkripsjonsaktivatorer [47], og det ble blant annet funnet ulik grad av metylering av 5'-AMP-aktivert protein kinase subenhet beta-1 hos personer med og uten forekomst av T2D i familiehistorien [48]. Dette innebærer at metyleringsgrad kan være av betydning for AMPK-aktivitet. Histoner er proteiner som bidrar til pakking av DNA til nukleosomer, og histon-modifiseringer (acetylering, metylering og fosforylering) kan både resultere i aktivering og inaktivering av genuttrykk ved å endre pakkemønsteret av nukleosomene [47].

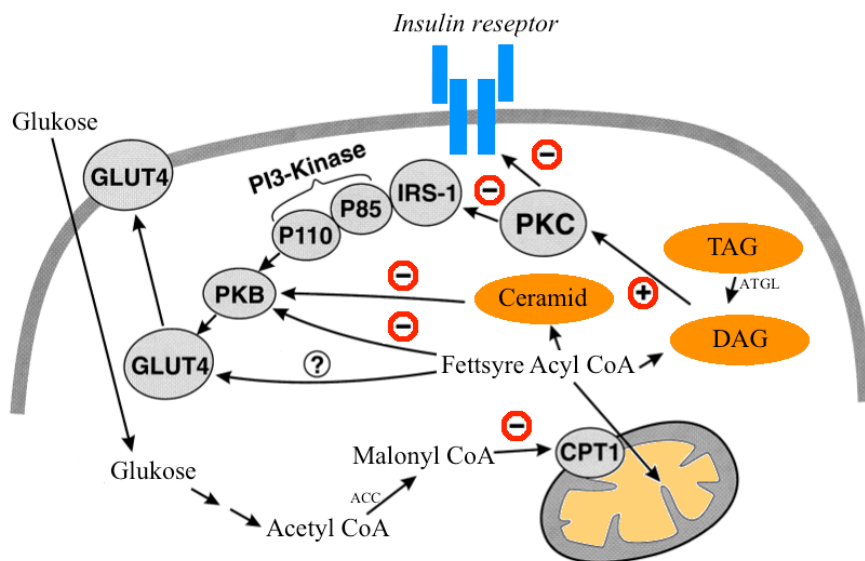
1.5 Atletparadokset

Atletparadokset innebærer høye verdier av IMTG i skjelettmuskel fra godt trente på samme måte som for overvektige og T2D-pasienter, men insulinsensitivitet er likevel bevart [26]. Atletparadokset er illustrert i figur 1.7. Sammensetningen og reguleringen av IMTG kan potensielt være av betydning for metabolske sykdommer.



Figur 1.7: Sammenheng mellom nivå av intramyocellulære triacylglycerol i skjelettmuskel (IMTG) og insulinresistens. Hos type 2-diabetikere sees insulinresistens ved høye IMTG-nivåer. På en annen side har utholdenhetstrente atleter også høye nivåer av IMTG, men er insulinsensitive. Dette fenomenet omtales som atletparadokset [26]. Faktum av dette innebærer at IMTG kun kan benyttes som en markør for insulinresistens, heller enn et diagnostisk verktøy. IMTG, intramyocellulært triacylglycerol.

IMTG-nivå har lenge vært assosiert med insulinresistens [49]. Årsaken til at atleter bevarer insulinfølsomheten, i motsetning til overvektige og T2D-pasienter, er imidlertid uklar. En teori er at dette fenomenet skyldes ulik lagringsform av lipidene, og at skjelettmuskel hos godt trente har større kapasitet for oksidativ metabolisme sammenlignet med utrente [26]. Lipolyse kan mediere til dannelsen av lipidintermediater [4], og som illustrert av figur 1.8 er det blant annet foreslått at ceramid, DAG og LCFA-acyl-CoA kan forstyrre insulinsignaleren [25, 50, 51].



Figur 1.8: Foreslått mekanisme for lipidindusert insulinresistens. Akkumulering/opphopning av lipidintermediater som følge av lipidoverskudd, i tillegg til manglende evne av skjelttmuskel til fettsyreoksidasjon slik at den oksidative kapasiteten overskrides, er foreslått å interferere med insulinsignaleren ved å hindre signaleringen av PKB (Akt). Som en følge nedsettes dermed insulinresponsen i cellene. ACC, acetyl-koenzym A karboksylase; ATGL, fettvevs triacylglycerol lipase; CPT1, karnitin-palmitoyltransferase 1; DAG, diacylglycerol; PI3K, fosfatidylinositol-3-kinase; PKB, protein kinase B; PKC, protein kinase C; TAG, triacylglycerol. Figur modifisert fra [51].

På den annen side er det vist opphopning av DAG hos utholdenhetstrengte og insulinresistente personer med høye nivåer av IMTG, og det kan tenkes at ulike varianter av intermediatene medfører ulike reguleringer [52]. Monoacylglycerol acyltransferase 2 og diacylglycerol acyltransferase 2 er enzym som har viktige roller i syntese av henholdsvis DAG og TAG, og samspill mellom disse er vist å fremme kobling av DAG og fettsyre-CoA i TAG syntese [53]. Disse enzymene kan på bakgrunn av dette potensielt ha en bakenforliggende rolle for atletparadokset i syntesen av IMTG. Evnen til å lagre TAG i LD er en beskyttelsesmekanisme mot lipotoksisitet cellene innehar [31]. Det er beskrevet i litteraturen at trening kan resultere i endring av LD-partiklenes egenskaper i form av endret morfologi og sammensetning, samt endret lokalisering og mobilisering, hvilket er ansett som en beskyttelsesmekanisme mot lipotoksisitet og insulinresistens [54]. Proteinuttrykk på LD er enda en teori som kan være av betydning for atletparadokset. Perilipiner (PLIN) er proteiner assosiert til LD som har flere ulike egenskaper. PLIN bidrar blant annet til bestemmelse av størrelse og stabilitet av LD, interaksjonsgrad mellom LD og mitokondriene i tillegg til å påvirke reguleringen av lipolyse, fettsyreoksidasjon og cellulært innhold av TAG [31, 52]. PGC1 α er ansett å ha en sentral rolle i mekanismen bak remodellering av LD til større interaksjon mellom LD og mitokondrier, hvilket stimulerer oksidasjon av lipolyse-genererte fettsyrer [4, 31, 54]. Dette kan potensielt

reducere dannelsen av lipidintermediater som kan interferere med insulinsignaleren. Teoriene om bedre interaksjon mellom LD og mitokondriene hos godt trente, står i sammenheng med teorien om hurtigere IMTG-omsetningen ("turnover") hos utholdenhetstrener atleter, hvilket menes at det foreligger en større balanse mellom nydannelse og nedbrytning av IMTG sammenlignet med utrente personer [50]. Det dynamiske samspillet mellom lipidsyntese og lipolyse påvirkes av ATP behovet, herunder fettsyreoksidasjon, i tillegg til fettsyretilgjengeligheten i plasma. Myotubers oksidative kapasitet, lipolyse, tilgjengelighet på fettsyrer samt reforestring av lipidintermediater, som for eksempel DAG, er faktorer av betydning for den dynamiske hastigheten for IMTG-omsetningen ("turnover") [22, 55]. Dermed er disse faktorene regnet for å ha betydning for myotubers insulinsensitivitet.

Videre er tilgjengeligheten av lipaser, spesielt HSL og ATGL, foreslått å ha viktige roller i forbindelse med IMTG mobiliseringen, men også monoacylglycerol lipase som spalter monoacylglycerol [22] er antatt å være av betydning for dynamikken av IMTG [4]. Mekanismen bak lipolyse er imidlertid ikke fullstendig klarlagt. HSL medierer i størst grad nedbrytningen av DAG, mens ATGL medierer nedbrytning av TAG [22]. HSL var lenge tenkt å være hovedansvarlig for lipolyse av IMTG ved stimuli av kontraksjon, men senere studier har antydning at ATGL i større grad medierer kontraksjonsmediert lipolyse [56]. Lipolyseaktivitet av ATGL på LD reguleres av fosforylering i tillegg til interaksjon med ko-regulatorene "comparative gene identification"-58 (CGI-58) og G0/G1 "switch gene" 2. Mekanismene er imidlertid ikke fullstendig klarlagte, men proteinkinase-mediert fosforylering er vist å resultere i at PLIN5 spalter CGI-58 til aktivering av ATGL, og dette har fått en antatt rolle i forbindelse med lipolyseaktivitet i skjelettmuskel. Videre er det rapportert om høyere ATGL-ekspresjon hos utholdenhetstrener individer sammenlignet med utrente [52]. Generelt er uttrykk av proteiner på LD tenkt å være av betydning for de observerte forskjellene, og PLIN5 er vist å være korrelert med insulinsensitivitet i tillegg til å være høyere uttrykt hos utholdenhetstrener individer sammenlignet med utrente [52]. I forbindelse med at økt tilgjengelighet av LD-proteiner i myotuber kan beskytte insulinsignaleren som følge av redusert produksjon av lipotoksiske lipidintermediater [57]. På bakgrunn av redusert oksidasjon av IMTG som følge av mitokondriell dysfunksjon, er forekomst av lipotoksitetet samt tilgjengeligheten av toksiske lipidintermediater tenkt å være økt. Mitokondrier er vist å være mindre samt mindre kompakte, i tillegg til at aktiviteten av ETK er redusert hos T2D og fedmepasienter [57].

1.6 Metabolsk fleksibilitet

Metabolsk fleksibilitet er fenomenet der det skjer et substratbytte i energiutnyttelsen som følge av de metabolske forholdene cellene er under. Ved tilstander som faste og vedvarende trening øker oksidasjonen av fettsyrer, mens ved normaltstanden etter et måltid dominerer glukoseoksidasjon som følge av stimulering av insulin [1]. Disse egenskapene kjenntegner en velfungerende muskel. Ved oppregulering av glukose- eller fettsyreoksidasjonen skjer samtidig en nedregulering av den andre prosessen. *In vitro*-korrelatet suppresjon en måte å beskrive myotubers evne til å være metabolsk fleksible, og innebærer fenomenet der et substrat medfører undertrykkelse av et annet. Metabolsk fleksibilitet beskrives også av uttrykket adapterbarhet som innebærer skjelettmuskelcellenes evne til å øke fettsyreoksidasjonen ved økt tilgjengelighet på fettsyrer. Videre er substratregulert fleksibilitet et tredje *in vitro*-korrelat som beskriver fenomenet ut i fra hvordan skjelettmuskelcellene evner å øke fettsyreoksidasjonen ved skifte fra en næringstilstand (lav tilgang på fettsyrer og høy tilgang på glukose) til en fastesituasjon (god tilgang på fettsyrer med lite glukose tilstede) [1]. I denne oppgaven vil suppresjonskorrelatet hovedsakelig bli benyttet til å beskrive metabolsk fleksibilitet av skjelettmuskelcellene, men de to andre parameterne er også omtalt.

Metabolsk infleksibilitet påvirkes i stor grad av livsstilsfaktorer, og er videre fellesnevner for metabolske sykdommer som fedme, insulinresistens, metabolsk syndrom (MetS) og T2D [36]. Dette sees blant annet i form av redusert oksidasjon av lipider både ved faste og under trening, samt svekket substratbytte fra oksidasjon av lipider til glukose etter inntak av et måltid. Sistnevnte observeres allerede ved nedsatt glukosetoleranse, hvilket indikerer at dysfunksjonell fleksibilitet av myotuber har en rolle tidlig i forløpet av T2D [1]. Faktum av dette gir gode holdepunkter for at livstilsendringer har positiv innvirkning på metabolsk fleksibilitet av skjelettmuskel. Både vekttap og trening bedrer metabolsk fleksibilitet ved å øke skjelettmuskelcellers evne til å regulere fettsyreoksidasjonen. Umettet fett er vist å være fordelaktig fremfor mettet fett som en følge av lavere fettsyreakkumulering i skjelettmuskel, og kan potensielt bedre cellenes metabolske fleksibilitet [36].

Glukose-fettsyre syklusen ble presentert av Randle et al. i 1963 [58]. Dette er en hypotese om at fettsyreoksidasjonen i skjelettmuskelen er avhengig av fettsyrenivået, og at fettsyreoksidasjonen videre begrenser glukosemetabolismen. Studier har imidlertid vist varierende resultater omkring hypotesen, men hypotesen støttes av flere studier som har vist at økt fettsyreoksidasjon resulterer i økt fettsyreoksidasjon og redusert glukoseoksidasjon [23,

51]. Mekanismen bak suppresjoneffekten av fettsyrer på glukosemetabolismen i skjelettmuskel er videre i stor grad tenkt å være en følge forstyrrelse i insulinsignaleringsen og derved redusert glukoseopptak på grunn av akkumulering av lipider og lipidintermediater som DAG, ceramid og LCFA-CoA [36]. En ytterligere teori er at økt nivå av acyl-CoA og citrat medfører opphopning av glukose-6-fosfat som resulterer i redusert opptak av glukose [51]. I tillegg har glukosenivået i skjelettmuskel vist påvirkning på fettsyreoksidasjonen. Glukose øker intracellulær konsentrasjon av malonyl-CoA i skjelettmuskel som videre inhiberer CPT1 og dermed også fettsyretransporten over mitokondrimembranen [51]. Dette er omtalt som en reversering av Randles hypotese.

1.7 Metabolske sykdommer

1.7.1 Overvekt og fedme

Spesielt i den vestlige verden er overvekt og fedme et økende problem i befolkningen, og en rapport fra Verdens helseorganisasjon i 2014 viste at 15 % av alle kvinner samt 11 % av alle menn, i en alder av 18 år eller eldre, var overvektige. Dette faktum medfører forverret helsetilstand i form av blant annet hypertensjon, dyslipidemi og insulinresistens, og gir økt risiko for kardiovaskulær sykdom, hjerneslag, enkelte krefttyper samt type T2D. Rapporten viste videre at 2,8 millioner mennesker dør hvert år som en konsekvens av fedme og overvekt [59]. Fettvevet har evne til å ekspandere i motsetning til de fleste andre vev, og dette skyldes både økt størrelse og antall adipocytter [60]. Dersom fettvevets lagringskapasitet overskrides kan dette medføre ektopisk lipidakkumulering [61]. Fettvevet et endokrint organ som bidrar i reguleringen av blant annet appetitt, energimetabolisme, immunrespons og insulinsensitivitet ved at adipocytene skiller ut cytokiner, fettsyrer, steroidhormoner og adipokiner. Leptin, resisin og adiponektin er eksempler på adipokiner, og fungerer som signalstoffer i kroppen [60].

1.7.2 Insulinresistens

Insulinresistens defineres som mangelfull biologisk respons av insulin i målorgan som skjelettmuskel, lever og fettvev [62], og som en kompensasjonsmekanisme medfører tilstanden hyperinsulinemi. Ved tidspunktet da β -cellene ikke lenger har evne til å ytterligere øke insulinsekresjonen vil det ikke lenger oppnås tilstrekkelig glukoserespons. Flere studier viser at tap av insulinsensitivitet er en prediabetisk tilstand som allerede oppstår før glukoseintoleranse, hyperglykemi og T2D er et faktum. Tilstanden er progredierende, og

resulterer ofte i tap av insulinsekresjon. Ektopisk fettakkumulering i insulinavhengige vev som følge av overskridelse av fettvevets lagringskapasitet er ofte observert hos overvektige og fedmepasienter, og konsekvensen av dette kan være lipotoksisitet som videre kan utvikle seg til insulinresistens fordi ugunstige lipidintermediatorer interfererer med insulinsignaleren [51, 61, 62] (se avsnitt 1.5 og figur 1.8).

1.7.3 Metabolsk syndrom (MetS)

MetS er ikke en sykdom, men en tilstand med mange ulike risikofaktorer, som gir økt risiko for kardiovaskulær sykdom, fedme, T2D og tidlig død. Tilstanden er et økende problem på verdensbasis, og er et samspill av både miljø og arvelige faktorer. På grunn av sin komplekse patofysiologi betegnes tilstanden ofte også som syndrom X. Sentrale risikofaktorer er insulinresistens, hypertensjon, visceral fedme, dyslipidemi, endotel dysfunksjon, hyperkoagulasjon og inflammasjon. MetS defineres på flere ulike måter. I 2005 dannet "The International Diabetes Federation" (IDF) en global fellesbetegnelse på tilstanden [63]. Definisjonen betegner syndromet som en tilstand der fedme, bestemt etter livvidde, er sentralt. Dette er på grunnlag av at fedme i stor grad er korrelert til både insulinresistens og de andre risikofaktorene som inngår i MetS. Grensen for livvidde er avhengig av etnisitet, og IDF definerer MetS som livvidde ≥ 94 cm for europeiske menn og ≥ 80 cm for europeiske kvinner. I tillegg kreves to eller flere av følgende tilleggsfaktorer: hypertensjon (blodtrykk $\geq 130/85$ mmHg) eller pågående behandling med blodtryksmedikamenter, forhøyet nivå av TAG (TAG $\geq 1,7$ mM), redusert nivå av HDL-kolesterol (HDL $\leq 1,03$ mM hos menn, $\leq 1,3$ mM hos kvinner), eller pågående behandling for dyslipidemi, hyperglykemi (fastende plasmaglukose $> 5,6$ mM) eller diagnostisert med T2D [64]. IDF har beregnet at en fjerdedel av voksne mennesker faller inn under diagnosen MetS ved denne definisjonen [63].

Personer med MetS har fem ganger økt risiko for å utvikle T2D i tillegg til to ganger økt risiko for å utvikle kardiovaskulær sykdom [63]. Det finnes ingen standard behandling for MetS, men livsstilsendringer i form av trening og vektreduksjon er sentralt i behandlingsregimet. Behandlingen bestemmes imidlertid avhengig av symptomer og samlet kardiovaskulær risiko [65].

1.7.4 Type 2-diabetes (T2D)

Forekomsten av stoffskiftesykdommen diabetes mellitus (fastende plasma-glukose $\geq 7,0$ mM, tidligere diagnostisert eller under medikamentell behandling) er økende [66], og i 2014 var hele 9 % av verdens befolkning diabetikere. Videre var diabetes årsak til 1,5 millioner dødsfall på verdensbasis i løpet av 2012 [59]. Av alle diabetikere var hele 90 % av rammet av T2D [67]. T2D er en metabolsk sykdom som følge av redusert eller fraværende sekresjon av insulin, i tillegg til redusert insulineffekt. Glykosylert hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c} - langtidsblodsukker) uttrykker konsentrasjonen av glukose de siste 6-8 ukene. I 2012 ble det anbefalt av Helsedirektoratet at $HbA_{1c} \geq 6,5$ % skulle være det primære diagnostiske kriterium for diagnose av diabetes [68], og at fastende plasma-glukose $\geq 7,0$ mM og/eller $\geq 11,1$ mM to timer etter inntak av 75 g glukose, og/eller tilfeldig plasma-glukose i kombinasjon med symptomer $\geq 11,1$ mM skulle benyttes som tillegg til diagnostiseringen [66]. T2D er kjennetegnet som ikke-insulinavhengig diabetes, og er en følge av redusert insulinrespons i tillegg til insulinmangel ved noen tilfeller. Tilstanden er en følge av blant annet økt glukoseproduksjon i leveren og nedsatt glukoseopptak i perifere vev, hovedsakelig skjelettmuskel, hvilket medfører et forhøyet blodglukosenivå. Økt serumnivå av fettsyrer samt økt glukagonproduksjon er andre faktorer av betydning. Videre er arv, inaktivitet og fedme risikofaktorer for utvikling av T2D [66]. Et sentralt behandlingsmål i behandlingen av diabetes er å redusere forekomsten av senkomplikasjoner på hjertet, lunger, nerver, blodårer og øyne [59, 66, 67]. Livsstilsendringer, vekttap ved fedme, røykeslutt og trening er viktige tiltak i behandlingsregimet for T2D. Behandlingsmål i norske retningslinjer $HbA_{1c} \leq 7,0$ mM, i tillegg til fastende-blodglukose $\geq 4 \leq 6$ mM og ikke-fastende-blodglukose $\geq 4 \leq 10$ mM [66]. I motsetning til tidligere, da T2D i størst grad var forekommende hos voksne, sees i dag denne diabetesformen også hos unge mennesker [67].

1.8 Trening som behandling ved metabolske sykdommer

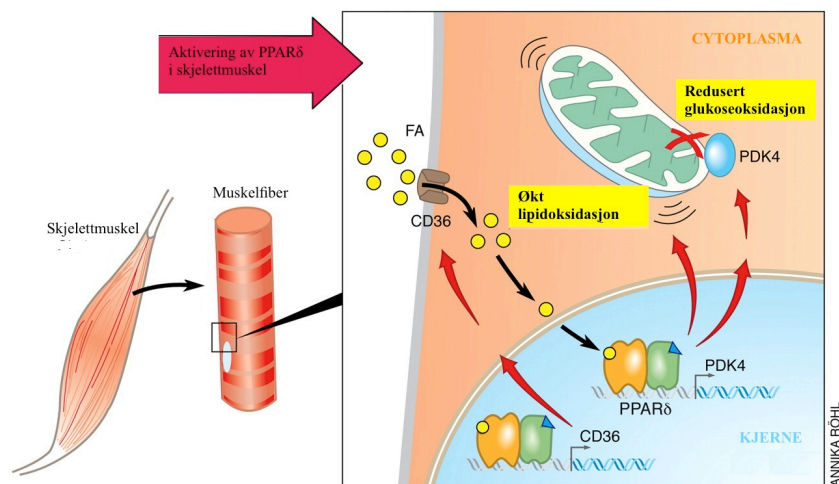
Trening er effektiv behandling mot en rekke metabolske sykdommer [21, 69]. I retningslinjer for behandling av metabolske sykdommer er fysisk aktivitet sentralt, og det er anbefalt minimum 30 minutter fysisk aktivitet hver dag [66]. Som nevnt i avsnitt 1.4 har trening flere gunstige effekter på energimetabolisme i skjelettmuskelceller. Det sees bedret metabolsk fleksibilitet av skjelettmuskelen, endret lipidmetabolisme, økt uttrykk av GLUT4 samt bedret insulinsensitivitet som følge av trening [21, 26, 33-36]. Mitokondrienes hovedoppgave er oksidasjon av energisubstratene i cellene, og deres funksjon er dermed essensiell for cellenes

energimetabolisme. Redusert mitokondriekapasitet ses i tidlig stadium av diabetes, og er foreslått som en årsak til utvikling av insulinresistens [70]. Likevel kan dette ikke fastslås fordi dysfunksjonen til mitokondriene også kan være en følge av den diabetiske tilstanden. Mitokondriell dysfunksjon medfører redusert fettsyreoksidasjon og dermed større grad av akkumulering av lipidintermediater som kan forstyrre insulinsignaleren [70]. På en annen side finnes studier som indikerer at da muskelcellene innehar reservekapasitet, er ikke mitokondriell dysfunksjon en absolutt faktor for lipidakkumulering og utviklingen av insulinresistens [6]. Det er rapportert økt uttrykk av henholdsvis CD36 [54] og CPT1 [35, 54] i skjelettmuskel fra godt trente, hvilket potensielt er gunstig ettersom redusert opptak og oksidasjon av fettsyrer er forelått som en mekanisme ved insulinresistens [51]. Større forståelse for mekanismer og effekter regulert av trening vil potensielt kunne optimalisere behandlingen av fedme og metabolske sykdommer.

1.9 Peroxisomproliferator-aktiverte reseptorer (PPAR)

PPAR er kjernereseptorer som fungerer som ligandaktiverede transkripsjonsfaktorer. Det er observert tre ulike isoformer: PPAR α , PPAR δ/β og PPAR γ [17] som alle har stor grad av strukturelle og funksjonelle likheter. PPAR heterodimeriserer med retinoid X reseptor (RXR - som er en annen kjernereseptor) etter aktivering av LCFA eller derivater av disse, komplekset bindes til PPAR-responselementer, og oppnår da evne til å regulere transkripsjon av gener [29]. Subtypene har ulike vevsdistribusjoner. PPAR α er primært uttrykt i vev der oksidativ lipidmetabolisme forekommer, herunder lever, nyrer, skjelettmuskel og hjertet [17], og har en sentral rolle i lipid- og lipoproteinmetabolismen. Denne isoformen har særlig viktig funksjon ved tilstander som faste og er viktig i reguleringen av ketogenesen [71, 72]. PPAR α er i tillegg distribuert i immunceller, og har en rolle i inflammasjonsrespons samt ved oksidativ stress [72]. Isoformen PPAR γ forekommer i størst grad i fettvev hvor kjernereseptoren bidrar til lagring av lipider ved å inducere uttrykk av viktige gener for fettsyretransport og lagring, i tillegg til at PPAR γ innehar en rolle i celledifferensiering til adipocytter og reguleringen av glukosemetabolismen [71, 73]. Via kjernereseptorens regulering av produksjonen av adipokiner som adiponektin, tumor nekrose faktor- α og resistin, som innvirker på insulinsensitivitet i lever og skjelettmuskel, bedres insulinsensitiviteten [71]. PPAR δ er en viktig sensor og regulator av energimetabolismen (figur 1.9), og er bredt distribuert i menneskekroppen. PPAR δ har en direkte effekt på energimetabolismen i skjelettmuskel, og dette er hovedsakelig hva som skiller PPAR δ fra andre PPAR [17]. I myotuber er det

isoformen PPAR δ som er høyest forekommende sammenlignet med PPAR α og PPAR γ . Videre er det vist et høyere uttrykk av PPAR δ i type 1-muskelfibre sammenlignet med type 2-fibre [17]. PPAR δ er kjent for å være regulator av viktige gener involvert i glukose- og lipidmetabolisme i skjelettmuskel som blant annet CD36, PDK4, CPT1a og 1b [16, 29]. Både faste og trening resulterer oppregulering av PPAR δ i skjelettmuskel, og PPAR δ regnes videre for å være viktigst av isoformene da det gjelder regulering av energisubstratutnyttelse ved faste. Denne reguleringen innebærer hovedsakelig induksjon av PDK4-transkripsjon som videre medfører redusert pyruvat dehydrogenasekompleks, derved hemmet glukoseoksidasjon og stimulering av fettsyreoksidasjonen [17]. Angiopoietin-relatert protein 4 er en potent inhibitor av LPL som også er et viktig målgjen for PPAR δ i skjelettmuskel, og PPAR δ -aktivering resulterer i inhibisjon av både LPL og LPL-avhengig fettsyreopptak [74].



Figur 1.9: Effekter av PPAR δ i skjelettmuskel. Aktivering av PPAR δ i skjelettmuskel medfører regulering av genuttrykk til økt lipidoksidasjon og -opptak ved å blant annet oppregulere CPT1 og CD36, samt redusert glukoseoksidasjon som følge av økt PDK4-ekspressjon. CD36, "cluster of differentiation" 36"; CPT, karnitin-palmitoyltransferase; PDK, pyruvat dehydrogenase kinase; PPAR δ , peroksisomproliferator-aktivert reseptor- δ ; FA, fettsyre. Figur modifisert fra [17].

1.9.1 Klinisk bruk av PPAR-agonister

Per i dag er agonister for PPAR α og PPAR γ tilgjengelig som legemidler. Disse er vist å være effektive innenfor behandlingen av dyslipidemi og som tilleggsbehandling ved T2D [17]. Fibratene gemfibrozil og fenofibrat er de to PPAR α -agonistene som markedsføres i Norge. Disse benyttes hovedsakelig som tilleggsmedikasjon ved dyslipidemi hos pasienter med T2D eller MetS som har høy risiko for kardiovaskulær sykdom, men kan også vurderes som monoterapi ved dyslipidemi [75]. Tiazolidindioner (glitazoner) er PPAR γ -agonister som er vist å bedre insulinsensitiviteten i tillegg til en mulig bedring av β -cellefunksjonen. Det har vært bekymring angående toksisitet og sikkerhet ved bruk, og som følge av levertoksisitet ble

det første derivatet, troglitazone, trukket fra markedet i 2000 [76]. I Norge i dag er pioglitazon den eneste PPAR γ -agonisten på markedet brukt som tilleggsmidikasjon ved T2D [75].

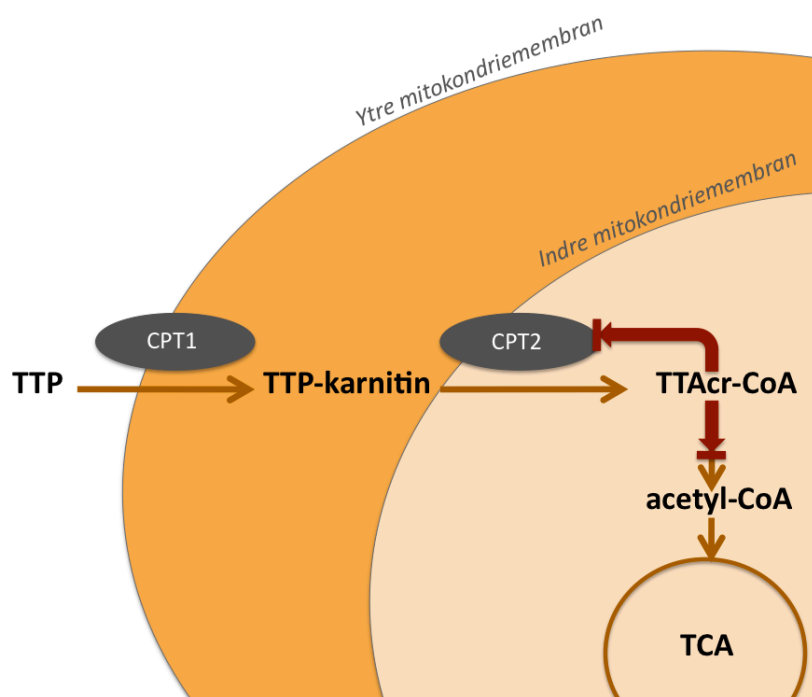
Det er foreløpig ingen registrerte PPAR δ -agonister på markedet, men flere er under klinisk utprøving samt at disse i stor grad benyttes innen forskning [17]. GW501516 er et eksempel på en slik substans som er mye brukt i forskningssammenheng. Videre har PPAR δ -agonister vist effektive resultater med hensyn på energimetabolisme, dyslipidemi og insulinresistens, men sikkerhet angående bruk er i mindre grad kjent. Det diskuteres og er vist motstridende resultater omkring effekt av PPAR-aktivering på celleproliferasjon og derved utvikling av tumor. I tillegg trengs det langtidsstudier for å undersøke om gunstige effekter på lipidmetabolismen er vedvarende ved en livsstil med manglende fysisk aktivitet eller om muligheten til å oppregulere PPAR δ -aktivitet samt endre genuttrykk deretter er et treningsavhengig fenomen. I forsøk på mus ble det sett at fysisk aktivitet var nødvendig for å oppnå treningseffekter, og at PPAR-aktivering heller ga en tilleggseffekt til fysisk trening, enn treningseffekt i seg selv [17].

1.10 Lever-X-reseptorer (LXR)

Lever-X-reseptorer (LXR) er kjernereseptorer som forekommer i to isoformer, LXR α og LXR β , som begge danner heterodimerer med RXR og regulerer genuttrykk. LXR er utbredt i vev som er viktige i forbindelse med biosyntese av lipider, og er i stor grad uttrykt i lever. Videre forekommer LXR α i størst i aktive metabolske vev som lever, tynntarm, nyre, fettvev og makrofager. LXR β , som er den mest utbredte isoformen, er vist å også være godt uttrykt i oksidative skjelettmuskelceller [77], og bidrar i regulering av lipogenese og kolesterol effluks [78]. Senere er det vist at LXR også er relatert til glukosemetabolismen ved å mediere til økt glukoseopptak og -oksidasjon i humane myotuber [79]. Studier på skjelettmuskelceller har i tillegg vist økt opptak og akkumulering av lipider, i tillegg økt fettsyreoksidasjon etter behandling med LXR-agonist [77, 79]. Det vil være nødvendig å undersøke omkring langtidsbehandling med LXR-agonist, i forhold til påvirkning på energimetabolismen samt om lipidakkumuleringen vil resultere i insulinresistens eller ikke. Lipidopptak og -akkumulering er rapportert å være høyere i myotuber fra individer med T2D sammenlignet med friske individer som følge av LXR-stimuli [79], et faktum som potensielt kan være negativt i forhold til insulinresistens.

1.11 Tetradecyltiopropionsyre (TTP)

TTP (tetradecyltiopropionsyre) er en mettet fettsyreanalog, men i stedet for karbon er et svovelatom plassert i 4-posisjon fra karboksylenden. Denne analogen forestres med CoA og undergår en syklus i β -oksidasjonen av fettsyrer i lever, før intermediet, tetradecyltioakrylkoenzym A (TTAcr-CoA), hindrer den videre oksidasjonen (figur 1.10) [80]. Mekanismen for TTP i lever er foreslått å være inhibisjon av enzymer som katalyserer mitokondriell fettsyreoksidasjon i lever. Intermediet TTAcr-CoA er tenkt å ha sin hovedeffekt på CPT2, som blokkerer overføring av acyl-CoA til matriks ved hindret transport av acylgrupper over innermembranen i mitokondriene [80, 81] til resultat av fettakkumulering [82]. TTP medfører økt serumkonsentrasjon av TAG og VLDL i rottelever, men har ingen påvirkning på sekresjon av VLDL [83]. Effekten av TTP på lever *in vitro* er vist å være momentant, mens effekten *in vivo* er både dose- og tidsavhengig [81].



Figur 1.10: Hypotetisk mekanisme for TTP-effekt. TTP er en 4-tiafettsyreanalog som undergår en syklus i β -oksideringen til dannelsen av TTAcr-CoA. Denne metabolitten er tenkt å ha en inhiberende effekt på CPT2 og er blokkert for videre fettsyreoksidasjon [80]. CPT, karnitin-palmitoyltransferase, TCA, trikarboksylsyresyklus; TTAcr-CoA, tetradecyltioakryl-CoA; TTP, tetradecyltiopropionsyre.

4-tiasubstituerte fettsyreanaloger modulerer nivåer av lipoproteiner (VLDL, LDL og HDL) i lever ved å regulere tilgjengeligheten av fettsyrer til dannelsen av TAG, og dermed påvirke balansen mellom fettsyreoksidasjon og biosyntese av glyserolipider [83]. Funksjonen av TTP på lipidmetabolismen i skjelettmuskel er imidlertid usikker.

1.12 Hensikten med oppgaven

Det er rapportert høye nivåer av intramyocellulære triacylglyseroler (IMTG) hos utholdenhetstrener atleter uten at dette påvirker insulinsensitiviteten. Det samme er observert for personer med overvekt og type 2-diabetes (T2D), bortsett fra at disse utvikler insulinresistens. Dette fenomenet ble omtalt som atletparadokset av Goodpaster et al. i 2001 [26]. På bakgrunn av dette var det ønskelig å undersøke energimetabolisme i differensierte skjelettmuskelceller (myotuber) fra unge menn kategorisert i en atletgruppe og en utrent gruppe for å få større forståelse for atletparadokset og mulige bakenforliggende mekanismer som regulerer IMTG. Studien vil kunne bidra til større kunnskap om behandling av metabolske tilstander som fedme, T2D og metabolsk syndrom (MetS).

Forsøkspersoner med $VO_2\text{maks} > 60 \text{ ml/min/kg}$ ble klassifisert som atleter mens individer som hadde $VO_2\text{maks} < 50 \text{ ml/min/kg}$ ble betegnet som utrente.

I tillegg ble betydningen av skjelettmuskelens fibertypefordeling for energimetabolismen i myotuber undersøkt.

Det ble satt følgende mål for oppgaven:

- Undersøke om glukoseopptak og -oksidasjon var forskjellig i myotuber fra atleter og utrente.
- Undersøke eventuelle forskjeller mellom gruppene med hensyn på oljesyreopptak og -oksidasjon i myotuber.
- Undersøke om myotuber fra atletgruppen viste bedre metabolsk fleksibilitet enn myotuber fra den utrente gruppen.
- Undersøke hvordan myotubene fra de to gruppene responderte på behandling med peroksisomproliferator-aktivert reseptor (PPAR δ)-agonisten GW501516, lever-X-reseptor (LXR)-agonisten Tularik (T0901317) og 4-tiafettsyreanalogen tetradecyltiopropionsyre (TTP).
- Undersøke om det var en forskjell i mRNA-ekspresjon av gener involvert i energimetabolismen for myotuber fra atleter og utrente individer.
- Undersøke betydningen av fibertypefordeling i biopsiene for henholdsvis mRNA-ekspresjon av fibertypemarkører og energimetabolisme i myotuber.
- Undersøke om det var en sammenheng mellom de kliniske dataene fra forsøkspersonene og observasjonene på energimetabolismen i myotubene.

2 Materialer og metoder

2.1 Materialer

Tabell 2.1 viser oversikt over utstyr, mens tabell 2.2 viser kjemikalier og reagenser som ble benyttet i forbindelse med studien.

Tabell 2.1: Utstyr.

Leverandør	Utstyr
Applied Biosystems™ (Foster City, CA, USA)	High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit
	MicroAMP® Optical 96-Well Reaction Plate
	MicroAMP® Optical Adhesive Film, PCR Compatible, DNA/RNA/RNase Free
	TaqMan reverse transcription kit reagents
Applied Biosystems™ (Stockholm, Sverige)	StepOnePlus™ Real-Time PCR System Thermal Cycling Block
Corning Inc. (Corning, NY, USA)	96-brønners Corning® CellBIND® Surface-brett (med lokk)
	Centrifuge Tube w/ CentriStar cap 15 ml
	Centrifuge Tube w/ CentriStar cap 50 ml
Eppendorf AG (Hamburg, Tyskland)	Safe-Lock rør 1,5 ml
Gibco®, Invitrogen™ (Gibco, Life Technologies, Eugene, OR, USA)	Countess™ counting chamber slides
Gibco®, Invitrogen (Gibco, Life Technologies, Paisley, Skottland, Storbritannia)	Countess automated cell counter
GraphPad Software, Inc. (La Jolla, CA, USA)	GraphPad Prism version 6.00 for Mac OS X
IBM Corp. (Armonk, NY, USA)	IBM SPSS Statistics for Macintosh, 22.0
Instrumentverkstedet (Teknisk avdeling, Universitetet i Oslo, Norge)	Trappestativ og utstyr (metallplate, metallskruer, silikonlapp)
Kubota Corporation (Tokyo, Japan)	Kubota Compact Tabletop Centrifuge 2010
Olympus (Tokyo, Japan)	Olympus CKX41 microscope med digitalkamera
Perkin Elmer Inc. (Shelton, Scotland, USA)	2450 Microplate Counter Micro Beta ² ®
	Isoplate™-96
	TopSeal®-A gjennomsiktig film
	Unifilter®-96 GF/B
	Wallac Victor ³ ™ 1420 Multilabel Counter
	Perkin Elmer PE 9700 Thermal Cycler
Thermo Scientific (Roskilde, Danmark)	Cryotube 4,5 ml
	Heraeus Fresco21 Centrifuge

Materialer og Metoder

	Nanodrop Lite Spectrophotometer
	Nunc™ 96-Well Polystyrene Conical Bottom MicroWell™ Plates
	Nunc™ EasYFlask™ 25 cm ² Nunclon™ Delta Surface (25 cm ² NUNC celleflaske)
	Nunc™ EasYFlask™ 75 cm ² Nunclon™ Delta Surface (75 cm ² NUNC celleflaske)
	Nunc™ MicroWell™ Plates with Nunclon™ Delta Surface
	Reagent Reservoirs with Dividers 25 ml
TPP®/MIDSCI® (St. Louis, MO, USA)	Cell scrapers, 24 cm
VWR® International (Radnor, PA, USA)	Fireboy™, Integra Safety Bunsen Burner
	PipetBoy™, Integra
	VWR Microcentrifuge MiniStar Silverline
QIAGEN® (Austin, Texas)	RNeasy Mini Kit
	QIAshredder

Figur 2.2: Kjemikalier og reagenser.

Leverandør	Kjemikalium/reagens
Agilent Technologies Inc. (Cedar Creek, TX, USA)	Nuclease-free H ₂ O, 25 ml
Applied Biosystems™ (Warrington, Storbritannia)	Power SYBR® Green PCR Master Mix (5 ml)
BioRad Laboratories Inc- (Hercules, CA, USA)	Bio-Rad Protein Assay Dye reagent Concentrate
Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA)	Tularik, T0901317
Fremstilt av Calin C. Ciocoiu (Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, Norge)	GW501516
Fremstilt av Professor Rolf K. Berge (Klinisk Institutt 2, Universitetet i Bergen, Norge)	Tetradecyltiopropionsyre (TTP)
Gibco®, Invitrogen (Gibco, Life Technologies, Paisley, Skottland, Storbritannia)	”Dulbecco’s Modified Eagle medium” med glutamax (DMEM/Glutamax-I 1 g/L glukose)
	Dulbeccos fosfatbufret saltløsning (uten Ca ²⁺ og Mg ²⁺)
	Føtalt kalveserum
	Føtalt bovint serum
	Fungizone® (250 µg/mg amphotericin B)
	Hanks bufret saltløsning (HBSS) uten Ca ²⁺ og Mg ²⁺
	Penicillin-streptomycin (10 000 IE/ml)
	Trypsin
Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)	Primere (36B4, CD36, CPT1a, CPT1b, CYC1, GAPDH, MYH7, MYH2, PDK4, PGC1α)
Lonza (Verviers, Belgia)	BioWhittaker® PBS (fosfatbufret saltløsning)

Lorenza Cloretics, levert av Medinor	SkGM Skeletal Muscle Growth SingleQuot Kit Supplements & Growth Factors
Merck Millipore (Billerica, MA, USA)	Natriumhydroksid (NaOH)
	Perklorsyre (HClO ₄)
Novo Nordisk A/S (Bagsværd, Danmark)	Actrapid [®] Penfill [®] 100 IE/ml
Pall Life Sciences (Cergy-Saint-Christophe, Frankrike)	Ultroser TM G
PerkinElmer [®] (Boston, MA, USA)	[1- ¹⁴ C]oljesyre 54,4 mCi/mmol
	D-[¹⁴ C(U)]glukose 3 mCi/mmol
PerkinElmer [®] (Shelton, Scotland, USA)	OptiPhase Supermix
QIAGEN [®] (Austin, Texas)	RNase-Free DNase Set
Sigma-Aldrich TM (St. Louis, MO, USA).	β-merkaptoetanol
	4-(2-hydroksyetyl)-1-piperazinetansulfonsyre (HEPES)
	Bovint serumalbumin (BSA)
	Collagen I
	Dimetylsulfoksid (DMSO)
	Glukose
	Karbonyl cyanid-4 (trifluorometoksy)-fenyldiazon (FCCP)
	L-karnitin hydroklorid
	L-glutamin
	Oljesyre
	Trypanblått 0,4 % løsning

2.2 Cellekarakteristika

Myotuber er differensierte skjelettmuskelceller. Disse er flerkjernede [84] til forskjell fra de fleste andre celletypene i menneskekroppen. Ved differensiering dannes modne skjelettmuskelfibre som ble benyttet til forsøkene (presentert i figur 3.1).

2.3 Cellebank

Opprettelse av ny spesifikk forskningsbiobank i forbindelse med atlet-studien ble godkjent av Regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK) 25.05.2012, referanse: 2011/2207/REK sør-øst B. Alle deltakerne ga samtykke til innhenting, oppbevaring og bruk av det biologiske materialet. Satelittceller fra en muskelbiopsi fra *musculus vastus lateralis* ble isolert. Dette er myogene stamceller som kan aktiveres til prolifererende myoblaste. Disse cellene bidrar normalt til reparasjon ved skade i muskel eller for å øke

muskelfibrenes størrelse, og cellene er plassert i nærheten av muskelfibrene, men har selv ikke utført muskelarbeid [5]. Satelittcellene ble videre oppskalert i tre passasjer til myoblaster som ble lagret i en nitrogentank.

2.3.1 Oppskalering

En ampulle ble tatt opp fra nitrogentanken og tint på vannbad ved 37 °C, før cellene videre ble fortynnet i 40 ml proliferasjonsmedium (se appendiks 1.2). Disse betingelsene fremmet proliferasjon av cellene. Dette volumet ble videre jevnt fordelt over fire 75 cm² NUNC celleflasker som var overflatebehandlet med 0,01 % kollagen (se avsnitt 2.4). Ved hjelp av lysmikroskop (Olympus) ble det sikret at det var rikelig med celler tilstede. Etter 24 timer ble det undersøkt at cellene hadde festet seg til overflaten, og inntil cellene var omtrent 50 % konfluente ble proliferasjonsmediet skiftet hver andre eller tredje dag. For å hindre spontandifferensiering til myotuber ble mediet da skiftet til et spesielt skjelettmuskelcelle vekstmedium (SkGM) inneholdende vekstfaktorer (se appendiks 1.4). Dette mediet ble byttet hver tredje dag inntil cellene hadde vokst til 80 % konfluens.

2.3.2 Nedfrysing

Etter at mediet var fjernet ble cellene vasket to ganger med 5 ml Hanks bufret saltløsning (HBSS) uten Ca²⁺ og Mg²⁺. Deretter ble 1 ml trypsin (0,25 %) tilsatt og 75 cm² celleflaskene ble satt til inkubasjon ved 37 °C, 5 % CO₂ i opptil 5 minutter, slik at cellene løsnet fra overflaten. Dette ble kontrollert ved hjelp av lysmikroskop (Olympus). Videre ble 5 ml utsåingsmedium tilsatt hver av 75 cm² NUNC celleflaskene. Cellesuspensjonene fra 75 cm² NUNC celleflaskene ble samlet i et 50 ml rør til et totalvolum på 20 ml. Celleantallet ble bestemt fra en 1:1 løsning av cellesuspensjon og 0,4 % Trypanblått ved hjelp av CountessTM Automated Cell Counter (InvitrogenTM) slik at mengde frysemedium nødvendig for å oppnå omtrent 1 million celler per ml kunne beregnes. Cellesuspensjonen ble sentrifugert ved 1300 rotasjoner per minutt (rpm.) i fem minutter og resuspendert i frysemedium (se appendiks 1.5). 1 ml cellesuspensjon ble deretter overført til kryorør som til slutt ble frosset ned ved -80 °C i Mr. FrostyTM Freezing Container (Thermo Scientific). Denne inneholdt isopropanol og sikret gradvis nedkjøling (1 °C per minutt). Fire timer senere ble cellene overført til nitrogentank for langtidslagring.

2.4 Kollagencoating

For at cellene i større grad skulle feste seg til overflaten ved oppdyrking, ble NUNC celleflaskene overflatebehandlet med 0,01 % kollagenløsning. Det ble tillaget en løsning av Collagen I i autoklavert vann. Bunnen av hver 25 cm² og 75 cm² NUNC celleflaske ble dekket godt av henholdsvis 2 ml og 5 ml av denne løsningen, og satt til coating over natt i kjøleskap (4 °C). Neste dag ble kollagenløsningen fjernet, og NUNC celleflaskene ble plassert uten kork i LAF-benk til tørking.

2.5 Dyrking av skjelettmuskelceller

2.5.1 Utsåing

Utsåingsmediet ble forvarmet til omtrent 37°C slik at temperaturen ble mer passende for cellene. To ampuller med celler ble hentet opp fra nitrogentanken, tint forsiktig før de ble overført til et 50 ml rør og videre fortynnet i 10 ml av utsåingsmediet. Røret ble deretter sentrifugert ved 1000 rpm. i fem minutter i Kubota Compact Tabletop Centrifuge 2010, før cellepelleten så ble resuspendert i 5 ml av utsåingsmediet. Dette mediet var næringsrikt og ga gode vekstvilkår for cellene. Cellesuspensjon og 0,4 % Trypanblått i forholdet 1:1 ble så tatt ut til et eppendorfrør, og videre overført til CountessTM Cell Counting chamber slides (InvitrogenTM) slik at det var mulig å bestemme antallet celler ved hjelp av CountessTM Automated Cell Counter (InvitrogenTM). Trypanblått penetrerte cellemembranen og farget døde celler, og på denne måten kunne antallet av både døde og levende celler beregnes. På bakgrunn av tellingen kunne det bli beregnet hvor stort volum som trengtes til utsåingen slik at det var 7000 celler per brønn i 96-brønners Corning[®] CellBIND[®] Surface-brettet og 150 000 celler per 25 cm² NUNC celleflaske. Et nytt rør med totalt 9 ml bestående av det beregnede volumet og utsåingsmedium ble, ved bruk av reservoar (Thermo Scientific) og multikanalspipette, direkte overført til 96-brønners Corning[®] CellBIND[®] Surface-brett. Videre ble totalt 6 ml cellesuspensjon fordelt likt i to 25 cm² NUNC celleflasker som var overflatebehandlet med kollagen. Cellene ble satt i inkubatoren i omtrent 24 timer ved 37 °C med 5 % CO₂.

2.5.2 Proliferasjon og differensiering

Dagen etter cellene var sådd ut ble utsåingsmediet erstattet av proliferasjonsmedium (se appendiks 1.2) i et tilsvarende volum. Dette mediet fremmet celledeling og ble byttet jevnlig hver andre eller tredje dag inntil det ble observert omtrent 80 % konfluent cellevekst ved hjelp av et lysmikroskop (Olympus). På dette tidspunktet, omtrent en uke etter utsåing, ble mediet igjen skiftet ut av tilsvarende volum differensieringsmedium (se appendiks 1.3) for å hindre spontan differensiering av cellene. Også dette mediet ble byttet hver andre eller tredje dag i omtrent en uke. I løpet av differensieringsperioden ble cellene utsatt for ulike behandlinger i varierende tidsperioder i løpet av de siste fire dagene (se avsnitt 2.5.3). Før forsøket ble satt i gang ble det sikret at cellene var differensiert til flerkjernede myotuber ved hjelp av lysmikroskop (Olympus).

2.5.3 Behandlinger av myotuber

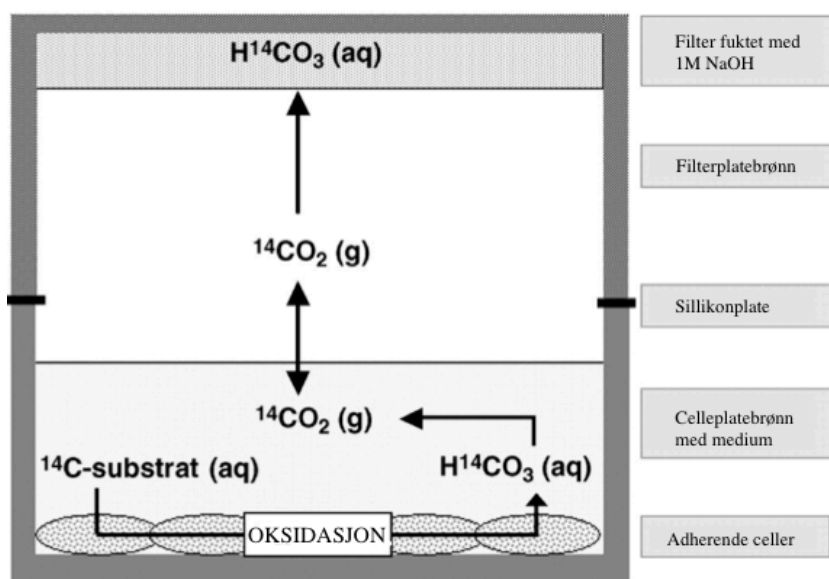
To og fire dager før forsøksdagen ble cellene på 96-brønners Corning® CellBIND® Surface-brettet behandlet med 10 nM av PPAR δ -agonisten GW501516, 1 μ M av LXR-agonisten Tularik (T0901317) eller 100 μ M av 4-tiafettsyreanalogen tetradecyltiopropionsyre (TTP). Enkelte brønner med myotuber ble behandlet med 1 μ M FCCP tilstede under substratoksidasjonsforsøkene (se avsnitt 2.6). Dette er en mitokondriell frikobler, og ved hjelp av denne var det mulig å få et mål på oksidativ reservekapasitet av oljesyre i myotuber. Utvalgte myotuber ble forbehandlet med 100 μ M eller 400 μ M [1-¹⁴C]oljesyre slik at det var mulig å se på effekter av en situasjon der myotubene hadde vært eksponert for fettsyre en tid før inkuberingen. Ved forbehandling var [1-¹⁴C]oljesyre tilstede i mediet myotubene ble eksponert for i 24 timer før trappingforsøket, mens det ble benyttet et ikke-radioaktivt medium (se appendiks 3.6) under inkuberingen i substratoksidasjonsforsøket.

25 cm² NUNC-celleflaskene til kvantitativ polymerase-kjedereaksjon (qPCR - se kapittel 2.7) ble behandlet med 10 nM GW501516. Myotuber ble behandlet med 0,1 % og 0,01 % dimetylsulfoksid (DMSO) som kontroll for henholdsvis myotuber behandlet med GW501516 og Tularik.

2.6 Deteksjon av substratoksidasjon og -akkumulering

2.6.1 Substratoksidasjonsmetoden

For å få et mål på muskelcellenes evne til å akkumulere og oksidere fettsyrer og glukose, ble det benyttet en metode utviklet av Wensaas et al. i 2007 [85]. Teorien innebærer radioaktivitetsmåling av ^{14}C -radiomerkede substrater. Trappesystemet er et lukket system der en filterplate fuktet med 1 M natriumhydroksid (NaOH) er plassert over cellebrettet slik at reaksjonens biprodukt CO_2 fanges opp som vist i figur 2.1.

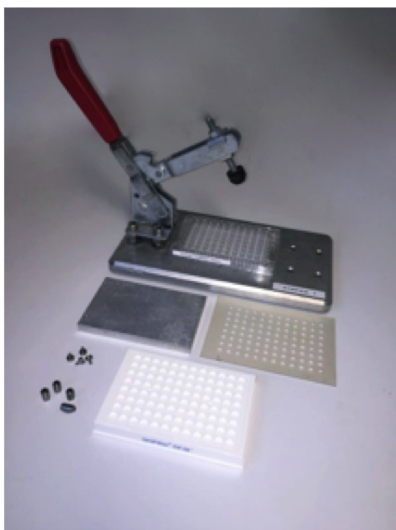


Figur 2.1: Teori bak substratoksidasjonsmetoden. Skjelettmuskelceller er festet til overflaten. Som følge av oksidasjon av ^{14}C -merket substrat blir CO_2 frigjort og fanget opp i det alkaliske filteret. Mengde substrat som akkumuleres, men som ikke blir oksidert av skjelettmuskelcellene, blir gjenværende i det nederste laget. Figuren er modifisert fra [85].

I tillegg ble celleassosiert (CA) radioaktivitet fra lysatet bestemt som et mål på mengden radioaktivt substrat akkumulert i cellene (se avsnitt 3.6.4). Mitokondriell β -oksidasjon av oljesyre ble bestemt ved analyse av syreløselige metabolitter (ASM - se avsnitt 2.3.2). Ved å summere disse tre resultatene ble opptaket bestemt som den totale omsetningen av oljesyre i cellene. Målingen av CO_2 ga et mål på oksidasjonen i cellene, mens CO_2 - og ASM-målingene samlet utgjorde totaloksidasjonen av oljesyre. Glukoseopptaket i myotubene ble bestemt ut ifra CO_2 - og CA-målingen, mens oksidasjonen av glukose ble uttrykt ved CO_2 -målingen. Differensieringsmediet ble deretter fjernet ved hjelp av sug før 50 μl forsøksmedium/trappemidium (se avsnitt 3.6.2) etter et bestemt skjema (se appendiks 7.1 og 7.2) ble tilsatt hver brønn. Utstyr til bruk til trapping er illustrert i figur 2.2 A og B. En silikonplate ble lagt mellom 96-brønnersbrettet og filterplaten før en metallplate ble lagt på toppen, og låst fast

ved hjelp av spaken. Dette sikret et lukket system, samt jevnt trykk over hele platen. Hele systemet ble inkubert ved 37 °C i fire timer med 5 % CO₂.

A



B



Figur 2.2: Utstyr brukt til trapping i substratoksidasjonsmetoden. A) 96-brønnersbrettet ble plassert i trapperen før en silikonplate ble festet over ved hjelp av metallskruer. Filterplaten ble fuktet med 1 M NaOH som ble plassert over med en metallplate på toppen. B) Trappesystemet er gjort klart til inkubering i fire timer. Spaken på trapperen sikret et lukket system med jevnt trykk over 96-brønnersbrettet gjennom hele inkubasjonstiden. NaOH, natriumhydroksid.

Etter endt inkubasjonstid ble trapperen demontert. 30 µl av det radioaktive oljesyremediet i hver brønn ble overført til 96-brønners NUNC-brett med konisk bunn for ASM måling, og brønnene i cellebrettet ble deretter vasket to ganger med 150 µl fosfatbufret saltløsning (PBS - vaskebuffer - appendiks 2.1). Til slutt ble hver brønn tilsatt 150 µl 0,1 M NaOH for å lysere cellene. Filterbrettet ble så tilsatt 40 µl Optiphas Supermix[®] tellervæske, forsegle og satt til inkubering i romtemperatur i to døgn før CO₂ ble målt på PerkinElmer 2450 Microplate Counter MicroBeta²[®]. Cellebrettet ble forsegle og lagret ved -20 °C.

2.6.2 Forsøksmedier

Til forsøkene ble det benyttet forskjellige forsøksmedier/trappemedier (se appendiks 3.1-3.7) for å se på cellenes reaksjoner ved ulike forhold. Myotubene var eksponert for disse mediene under inkuberingen i substratoksidasjonsforsøkene i fire timer. Energimetabolisme av glukose ble undersøkt ved bruk av 200 µM D-[¹⁴C(U)]glukose. Fettsyremetabolismen ble undersøkt ved henholdsvis 100 µM og 400 µM [1-¹⁴C]oljesyre, bundet til bovint serumalbumin (BSA) i forholdet 2,5:1. For å undersøke metabolsk fleksibilitet og herunder evne til substratskifte gjennom *in vitro*-korrelatet suppresjon ble energimetabolisme av 100 µM [1-¹⁴C]oljesyre bestemt ved tilstedeværelse (akuttbehandling) av 200 µM og 5 mM ikke-radioaktiv glukose

under inkuberingstiden (fire timer). På samme måte ble metabolisme av 200 μM D-[$^{14}\text{C}(\text{U})$]glukose undersøkt ved tilstedeværelse (akuttbehandling) av 100 μM ikke-radioaktiv oljesyre.

2.6.3 Analyse av syreløselige metabolitter

For at skjelettmuskelcellenes oljesyreopptak skulle bli mest mulig korrekt ble mengde ASM bestemt som et mål på mitokondriell β -oksidasjon. Som beskrevet under avsnitt 2.3.1 ble 30 μl medium tatt ut fra hver brønn til 96-brønners NUNC-brett med konisk bunn, og lagret ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for senere analyse. På analysedagen ble brettene tint i inkubatoren før hver brønn ble tilsatt 10 μl 6 % BSA og 100 μl 1 M Perklorsyre (HClO_4). Dette resulterte i utfelling av BSA/lipidkomplekser. Videre var det ønskelig å separere bort utfellingene, og brettene ble derfor sentrifugert ved 2100 rpm. ved $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 10 minutter slik at utfellingene skulle samle seg som en pellet i bunnen av brønnene. For å unngå reløsing av pelletten i supernatanten var det viktig at sentrifugen holdt lav temperatur og at temperaturen forble lav inntil 30 μl av supernatanten ble tatt ut fra hver brønn til en scintillasjonsplate. Til slutt ble 150 μl Optiphas Supermix[®] tellevæske tilsatt hver brønn, brettet ble forseglet med Topseal[®]-A plastfilm og videre inkubert ved romtemperatur i en time. Ved hjelp av Perkin Elmer 2450 Microplate Counter Micro Beta^{2®} ble ASM analysert.

2.6.4 Celleassosiert radioaktivitet (CA)

Cellebrettet med lysatene fra substratoksidasjonen ble tint før 50 μl lyasat ble overført fra hver brønn til et 96-brønners Isoplate brett for å kunne beregne CA. Videre ble 100 μl Optiphas Supermix tellevæske tilsatt før brettet ble forseglet med Topseal[®]-A plastfilm og inkubert ved romtemperatur i to timer. Ved hjelp av Perkin Elmer 2450 Microplate Counter Micro Beta^{2®} ble CA målt.

2.6.5 Måling av protein ved hjelp av Bradfords metode

Proteinverdiene (mg/ml) ble beregnet fra cellelysate etter Bradfords metode [86], og brukt som mål for å kunne relatere de ulike radioaktivitetsmålingene til antallet celler tilstede i brønnene. Ettersom det ble korrigert for proteinverdien kunne resultatene fra ulike donorer sammenlignes på en bedre måte. 96-brønnersbrettet som var frosset ned ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ble tint i inkubatorskapet, og 50 μl cellelysate ble overført til hver brønn i en 96-brønners mikrotiterplate. For å sikre overføringen av celler ble bunnen skrapet og lysatet blandet flere

ganger ved hjelp av pipetten. Videre ble brønnene tilsatt 200 µl fortynnet (1:5) Bio-Rad Protein Assay Reagent Concentrate som inneholdt stoffet Coomassie Brilliant Blue G-250. Som følge av reaksjon med aromatiske og basiske aminosyrer medførte reagenset fargeskifte fra rødt til blått. I tillegg ble det tillaget standarder med kjente proteinkonsentrasjoner (0, 5, 10, 20, 40, 80 og 160 µg/ml) løst i 0,1 M NaOH. Fargene ble analysert visuelt før mikrotiterplaten med de kjente standardene og de ukjente prøvene ble plassert i Wallac Victor² for en nøyaktig bestemmelse. Absorbansen ble målt ved 595 nm. På bakgrunn av de tillagde standardene genererte maskinen en standardkurve som konsentrasjonen i de ukjente prøvene videre kunne bli beregnet ut ifra.

2.7 Kvantitativ polymerase-kjedereaksjon (qPCR)

Kvantitativ polymerase-kjedereaksjon (qPCR), også kalt real-time revers-transkriptase-polymerase-kjedereaksjon, er en kvantitativ metode som kan beregne mRNA-ekspressjon ut fra en standardkurve.

2.7.1 Celledyrking og høsting til qPCR

Skjelettmuskelceller fra de samme donorene ble dyrket til flerkjernede myotuber i 25 cm² NUNC celleflasker på samme måte som i avsnitt 2.5.1 og 2.5.2. Det ble sådd ut 150 000 celler i et totalvolum på 3 ml per 25 cm² NUNC celleflaske. Etter differensiering i en uke, hvilket inkluderte behandling med GW501516 (10 nM) samt 0,1 % DMSO (kontroll - se avsnitt 2.5.3), ble cellene i 25 cm² NUNC celleflaskene høstet. Dette ble utført ved at differensieringsmediet ble fjernet og ble cellene vasket to ganger med 3 ml HBSS uten salter som ellers kunne reagert med lysisbufferen og forstyrret lyseringsprosessen. Deretter ble 500 µl RNeasy Plus lysisbuffer (QIAGEN) fordelt godt på 25 cm² NUNC celleflaskens bunn. Ved bruk av celskrape ble cellene løsnet slik at de kunne bli overført til et sterilt eppendorfrør, og overføringen ble sikret ved bruk av lysmikroskop (Olympus).

2.7.2 Isolering av RNA

Isolering av RNA ble utført etter en standardisert prosedyre utarbeidet av QIAGEN ved å benyttet QIAshredder, RNeasy Mini Kit og RNase-Free DNase Set (QIAGEN). Det var viktig å arbeide med RNasefritt utstyr slik at et størst mulig utbytte kunne isoleres og for å redusere nedbrytningen av RNA. For å sikre lyseringen av cellene ble lysatet først overført til en QIAshredder Mini Spin kolonne og sentrifugert i tre minutter i MiniStar silverline (VWR).

Filtratet ble tilsatt 500 µl 70 % etanol (samme mengde brukt ved lyseringen), overført til en RNeasy mini spinnkolonne og sentrifugert i 15 sekunder ved 10 000 rpm. i Heraeus Fresco 21 centrifuge (Thermo Scientific). Dette ble gjort i to trinn ettersom kolonnen maksimalt kunne filtrere 700 µl av gangen. Videre ble kolonnen vasket med 350 µl RW1 vaskebuffer og sentrifugert i 15 sekunder ved 10 000 rpm. for å få mest mulig rent RNA. En løsning av 70 µl RDD-buffer og 10 µl DNase1 (løst i RNasefritt vann) ble tilsatt membranen i kolonnen og inkubert ved romtemperatur i 15 minutter. Dette trinnet sikret at DNA som eventuelt var tilstede i prøven ble fjernet. Deretter fulgte enda et vasketrinn med 350 µl RW1 vaskebuffer. Videre prosedyre innebar vasking to ganger med 500 µl RPE vaskebuffer (tilsatt etanol) og etterfølgende sentrifugeringer ved 10 000 rpm. i henholdsvis 15 sekunder og to minutter. Deretter ble kolonnen overført til nye elueringsrør og sentrifugert i 1 minutt ved 10 000 rpm. RNA ble til slutt eluert ut til Eppendorfrør i 30 µl RNasefritt vann (sentrifugering i 1 minutt, 10 000 rpm.) Rørene ble frosset ned ved -70 °C.

2.7.3 Spektrofotometrisk kvantifisering av RNA

Konsentrasjon og renhet av RNA ble målt ved hjelp av NanoDropTM Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific). Konsentrasjonen av 1 µl prøve ble bestemt som ng/µl. På bakgrunn absorbansen ved 260 nm (A_{260}) beregnet instrumentet konsentrasjonen. Prøven ble sammenlignet med en blankprøve (nukleasefritt vann). I tillegg ble absorbansen målt ved 280 nm (A_{280}), hvilket anga proteinmengde, slik at prøvens renhet kunne bestemmes som forholdet A_{260}/A_{280} . Et forhold lik 2 var optimalt, men $A_{260}/A_{280} > 1,8 < 2,0$ ble godtatt som en ren RNA-prøve. Et forhold større enn to indikerte at prøven var forurensset av andre proteiner enn RNA.

2.7.4 Syntese av cDNA

RNA ble revers transkribert til cDNA-kopier for å kunne bli kvantifisert ved hjelp av qPCR-metoden [87]. Til dette formålet ble TaqMan Reverse Transcription Reagents-kit (Applied BiosystemsTM) benyttet. 1 µg RNA ble tatt ut av hver prøve, og videre overført til et mini-eppendorfrør, før prøvene ble tilsatt nukleasefritt vann til et totalvolum på 13,2 µl. Deretter ble det tilsatt 6,8 µl reaksjonsblanding (se appendiks 4.1), før prøven ble plassert i Perkin Elmer PE9700 Thermal Cycler for cDNA-syntetisering. Prosessen bestod av tre trinn. Først forekom heksamer/templat priming ved 25°C i 10 minutter Deretter ble komplimentært DNA

(cDNA) generert fra RNA templatet (revers transkribering), ved 37 °C i 80 minutter. Til slutt ble revers transkriptase inaktivert ved 85 °C i fem minutter.

2.7.5 qPCR

I starten av prosessen steg temperaturen gradvis, hvilket førte til begynnende denaturering (separasjon av DNA-tråden). Deretter forekom amplifisering (kopiering) av DNA-tråden i flere sykluser. Hver syklus bestod av en denatureringsfase ved 95 °C i 15 sekunder. Den spesifikke primeren ble deretter festet til den komplementære sekvensen til målgenets DNA (annekering av primer) i en hybridiseringsfase ved 60 °C i ett minutt, før DNAet ble amplifisert (polymerisering). Primeren festet seg til DNA-tråden ved et bestemt smeltepunkt, og i dette siste trinnet (dissosiasjonsfasen) ble dissosiasjonskurven produsert. Visuell kontroll av denne kurven sikret at ikke andre uspesifikke produkter var dannet i prosessen. Ved slutten av hver syklus startet prosessen på nytt. Amplifiseringen forekom ved en periode eksponentielt, og den totale mengden tråder etter n runder var da 2^{n+1} . Kvantifiseringen av genuttrykket måtte skje i denne delen av qPCR-reaksjonen der mengde produkt overgikk en detekterbar terskelverdi (Ct-verdien), vanligvis etter 20-25 sykluser. Ved Ct-verdien var økningen i fluorescens, og dermed også cDNA, eksponentiell. Til metoden ble SYBR[®] Green benyttet fordi reagenset festet seg til dobbelttrådig DNA og forsterket fluorescens, slik at intensiteten av SYBR[®] Green kunne benyttes til å bestemme mengden av cDNA tilstede i prøven. Resultatene ble standardisert ved å benytte referansegener i tillegg til genene som var ønsket kvantifisert. På denne måten ble det korrigert for variable mengder RNA i hver prøve. Referansegenene måtte ikke være påvirket av eksperimentet i tillegg til å være stabilt uttrykt i alle celler [87]. I dette forsøket ble syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0 (36B4) og glyseraldehyd 3-fosfatdehydrogenase (GAPDH) benyttet som referansegener. Kvantifiserte gener er presentert i tabell 2.4.1.

Fra cDNA-prøvene ble det laget standarder til en standardkurve som ble benyttet til å beregne amplifisert cDNA i hver prøve. 2 µl cDNA ble først fortynnet 1:5 med nukleasefritt vann (standard 1000), som videre ble fortynnet 1:2 til henholdsvis standard 500, 250 og 125 (se appendiks 5.1). På samme måte som standard 1000 ble prøvene fortynnet 1:5 i nukleasefritt vann (se appendiks 5.3). Deretter ble 2,5 µl av prøvene, standardene og nukleasefritt vann (negativ kontroll) tilsatt på en MicroAmp[®] Optical Reaction Plate. Til slutt ble spesifikke primere fortynnet til 30 µM (se appendiks 5.2) og tilsatt i en reaksjonsblanding (se appendiks 5.4). Oversikt over primere er vist i tabell 2.4.2. Primer og reaksjonsblanding ble tilsatt hver

brønn på en MicroAMP[®] reaksjonsplate, og dette ble plassert i StepOnePlus[™] Real-Time PCR System Thermal Cycling Block (Applied Biosystem) for analyse.

2.7.6 Kvantifiserte gener

Tabell 2.3: Kvantifiserte gener og deres funksjon.

ETK, elektrontransportkjeden; PDC, pyruvatdehydrogenase-komplekset

Gen	Funksjon
Cytokrom c-1 (CYC1)	Membranprotein i mitokondriene som er viktig for elektronoverføringer i ETK [88]
Karnitin-palmitoyltransferase (CPT) 1 a og b	Transmembranproteiner som er viktige for mitokondriell fettsyreoksidasjon [89]
Peroksisomproliferator-aktivert reseptor gamma koaktivator-1 α (PGC1 α)	Transkripsjonskoaktivator og regulator av cellulær energimetabolisme [43]
"Cluster of Differentiation" 36 (CD36)	Fettsyretransportør [23]
Myosin tungkjedegen-2A (MYH2)	Uttrykk av fibertype 2A
Myosin tungkjedegen- β (MYH7)	Uttrykk av fibertype 1
Pyruvat dehydrogenase kinase (PDK) 4	Inhiberer PCD og reduserer da glukoseoksidasjon hvilket fører til et skifte over til fettsyreoksidasjon [17]
Syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0 (36B4)	Referanseggen
Glyseraldehyd 3-fosfatdehydrogenase (GAPDH)	Referanseggen

2.7.7 Primere benyttet til qPCR

Tabell 2.4: Primere benyttet i metoden. Alle primerne benyttet i metoden ble fortynnet til 30 μ M. 36B4, Syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0; CD36, "cluster of differentiation" 36; CYC1, cytokrom c-1; F, forward; GAPDH, glyseraldehyd 3-fosfatdehydrogenase; CPT, karnitin palmitoyltransferase; MYH7, myosin tungkjedegen- β ; MYH2, myosin tungkjedegen-2A; PDK, pyruvat dehydrogenase kinase; PGC1 α , PPAR γ koaktivator-1 α ; R, reverse.

Gen	Genbanknummer	
CYC1	NM001916	F: 5'-CTGCCAACAACGGAGCATT-3' R: 5'-CGTGAGCAGGGAGAAGACGTA-3'
CPT1a	L39211	F: 5'-TGCTTTACAGGCGCAAACCTG-3' R: 5'-TGGAATCGTGGATCCCCAAA-3'
CPT1b	D1852C12	F: 5'-GAGGCCTCAATGACCAGAATGT-3' R: 5'-GTGGACTCGCTGGTACAGGAA-3'
PGC1 α	NM013261.3	F: 5'-AAAGGATGCGCTCTCGTTCA-3' R: 5'-TCTACTGCCTGGAGACCTTGATC-3'
CD36	L06850	F: 5'-AGTCACTGCGACATGATTAATGGT-3' R: 5'-CTGCAATACCTGGCTTTTCTCAA-3'
MYH2	C5814	F: 5'-AAGGTCGGCAATGAGTATGTCA-3' R: 5'-CAACCATCCACAGGAACATCTTC-3'
MYH7	NM000257.2	F: 5'-CTCTGCACAGGGAAAATCTGAA-3' R: 5'-CCCCTGGACTTTGTCTCATT-3'
PDK4	BC040239	F: 5'TTTCCAGAACCAACCAATTCACA-3' R: 5'-TGCCCGCATTGCATTCTTA-3'
36B4	M17885	F: 5'-CCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3' R: 5'-AGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3'
GAPDH	NM002046	F: 5'-TGCACCACACCTGCTTAGC-3' R: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'

2.8 Immunhistokjemi

Et tverrsnitt (8 μ M) fra hver skjelettmuskelbiopsi ble tillaget ved bruk av mikrotom ved -20°C, og plassert på et mikroskop slide. Dette ble behandlet i 30 minutter med 1 % BSA, 0,05 % PBS og 0,01 % Tween20. Muskeltverrsnittene ble behandlet med MYHC2-antistoff og dystrofin i 120 minutter ved 20°C, før inkubering med passende sekundærantistoff. Etter hver inkubering ble prøvene vasket to ganger i 10 minutter med 0,05 % PBS. På denne måten ble MYHC2 farget grønne og dystrofin ble farget rødt. Det ble tatt bilder av hvert muskeltverrsnitt ved bruk av kamera gjennom et mikroskop (Olympus) med fluorescenslyskilde. Dataprogrammet TEMA ble brukt for å analysere fibertypefordeling.

Fibertypefordelingen i biopsien ble analysert av Håvard Wiig ved Norges idrettshøgskole, Oslo.

2.9 Formler til beregninger av metabolismeparametere

Oksidativ reservekapasitet ble beregnet som:

$$\left[\text{oksidasjon av oljesyre etter FCCP - behandling} - \text{oksidasjon av oljesyre uten FCCP - behandling (basal)} \right]$$

Oljesyresuppresjon ble beregnet som:

$$\left[\left(1 - \left(\frac{\text{oksidasjon av } 200 \mu\text{M glukose ved tilstedeværelse av } 100 \mu\text{M ikke - radioaktiv oljesyre}}{\text{oksidasjon av } 200 \mu\text{M glukose uten tilstedeværelse av ikke - radioaktiv oljesyre}} \right) \right) \cdot 100 \% \right]$$

Glukosesuppresjon ble beregnet på lignende måte:

$$\left[\left(1 - \left(\frac{\text{oksidasjon av } 100 \mu\text{M oljesyre ved tilstedeværelse av } 200 \mu\text{M eller } 5 \text{ mM ikke - radioaktiv glukose}}{\text{oksidasjon av } 100 \mu\text{M oljesyre uten tilstedeværelse av ikke - radioaktiv glukose}} \right) \right) \cdot 100 \% \right]$$

Adapterbahet ble beregnet som:

$$\left[\frac{\text{oksidasjon av } 400 \mu\text{M oljesyre}}{\text{oksidasjon av } 100 \mu\text{M oljesyre}} \right]$$

Substratregulert fleksibilitet ble beregnet som:

$$\left[\frac{\text{oksidasjon av } 400 \mu\text{M oljesyre uten tilstedeværelse av ikke - radioaktiv glukose}}{\text{oksidasjon av } 100 \mu\text{M oljesyre ved tilstedeværelse av } 5 \text{ mM ikke - radioaktiv glukose}} \right]$$

2.10 Statistikk

Samtlige data er presentert som gjennomsnitt \pm standardfeilen til gjennomsnittet (SEM), og antallet uavhengige forsøk er representert av n. Gjennomsnittsverdien for hver donor ble beregnet fra åtte paralleller i substratoksidasjonsforsøkene og to paralleller i qPCR-forsøkene. Oljesyremetabolismen ble imidlertid beregnet fra gjennomsnittet av to forsøksoppsett som hver inkluderte 8 paralleller for hver donor. Signifikansnivået ble satt til 5 % ($\alpha=0,05$) for alle analysene, mens signifikansnivå mellom 5-10 % ($0,05 < \alpha < 0,10$) ble angitt som tendens. Alle utvalgene viste seg å være ikke-normalfordelte, i tillegg til at alle populasjonene hadde liten n. På bakgrunn av dette ble Wilcoxon-test for paret sammenheng (behandlingseffekter) og Mann-Whitney-test for uparet sammenheng (gruppeeffekter) mellom utvalgene benyttet ved bruk av GraphPad Prism, version 6.0 for Mac OS X (GraphPad Software Inc, La Jolla, California). For å sammenligne samlet effekt ble imidlertid statistisk blandet modellanalyse ("Mixed model analysis") i SPSS Statistics 20 (IBM SPSS Statistics for Macintosh, versjon 22.0. Armonk, NY, USA) benyttet. Resultatene er hovedsaklig presentert som nmol/mg, men også som relative verdier ved enkelte tilfeller.

Spearman's korrelasjonstest ble benyttet til korrelasjonsanalyse da denne ikke forutsetter en bestemt parametrisk fordeling av dataene (ikke-lineær sammenheng). SPSS Statistics 20 (SPSS Software Inc. Chicago, Illinois ble benyttet til analysen. Korrelasjonskoeffisienten, ρ , angir styrke og fortegn på sammenhengen mellom to variable. Korrelasjonslinjene på figurene beskriver en lineær sammenheng, og står derfor ikke i sammenheng til ρ , men er ment som et hjelpeverktøy.

3 Resultater

3.1 Kliniske data

Forsøkspersonene som deltok i denne studien var friske og unge menn. Individer fra atletgruppen hadde signifikant høyere aerob kapasitet enn individer fra utrentgruppen, og gjennomsnittlig VO_2maks var henholdsvis 64,9 ml/kg/min for individer i atletgruppen og 41,1 ml/kg/min for individer i utrentgruppen (tabell 3.1). Oppnådd maksimal laktatkonsentrasjon (ved VO_2maks) var signifikant høyere hos individer fra atletgruppen sammenlignet med utrente individer. Forholdet mellom fibertype 1 og fibertype 2 var høyere i biopsier fra atletgruppen enn utrentgruppen, med dette var imidlertid ikke signifikant. Respiratorisk utvekslingsforhold (RER), forholdet mellom antall liter karbondioksid (VCO_2) og antall liter oksygen (VO_2), ble benyttet for å si noe om energimetabolismen. Ved $\text{RER} > 0,7 < 0,85$ forbrukes hovedsakelig fett til energiproduksjon, mens ved $\text{RER} > 0,85$ er karbohydrater den dominante energikilden [90]. RER ble benyttet til å predikere fettsyre- og glukoseoksidasjonen, og ved 60 % belastning var RER-verdiene like for de to gruppene. Subjektiv opplevd anstrengelse, målt ved hjelp av Borgs skala, var også lik for de to gruppene ved 75 % belastning.

Fastende serum glukose var signifikant lavere for utholdenhetstrente individer sammenlignet med utrente, men var likevel innenfor anbefalt referanseområdet for begge gruppene [91]. Kliniske data for atle- og utrentgruppen er presentert i tabell 3.1.

Resultater

Tabell 3.1: Kliniske data for gruppene. Alle forsøkspersonene var friske unge menn. fS-Glukose, fastende serum glukose; fS-TAG, fastende serum triacylglycerol; KMI, kroppsmasseindeks; RER, respiratorisk utvekslingsforhold; SEM, standardfeil til gjennomsnittet; S-HDL, serum "high-density" lipoprotein; S-LDL, serum "low-density" lipoprotein; VO₂maks, maksimalt oksygenopptak. *p<0,05, **p<0,01 vs. utrentgruppen.

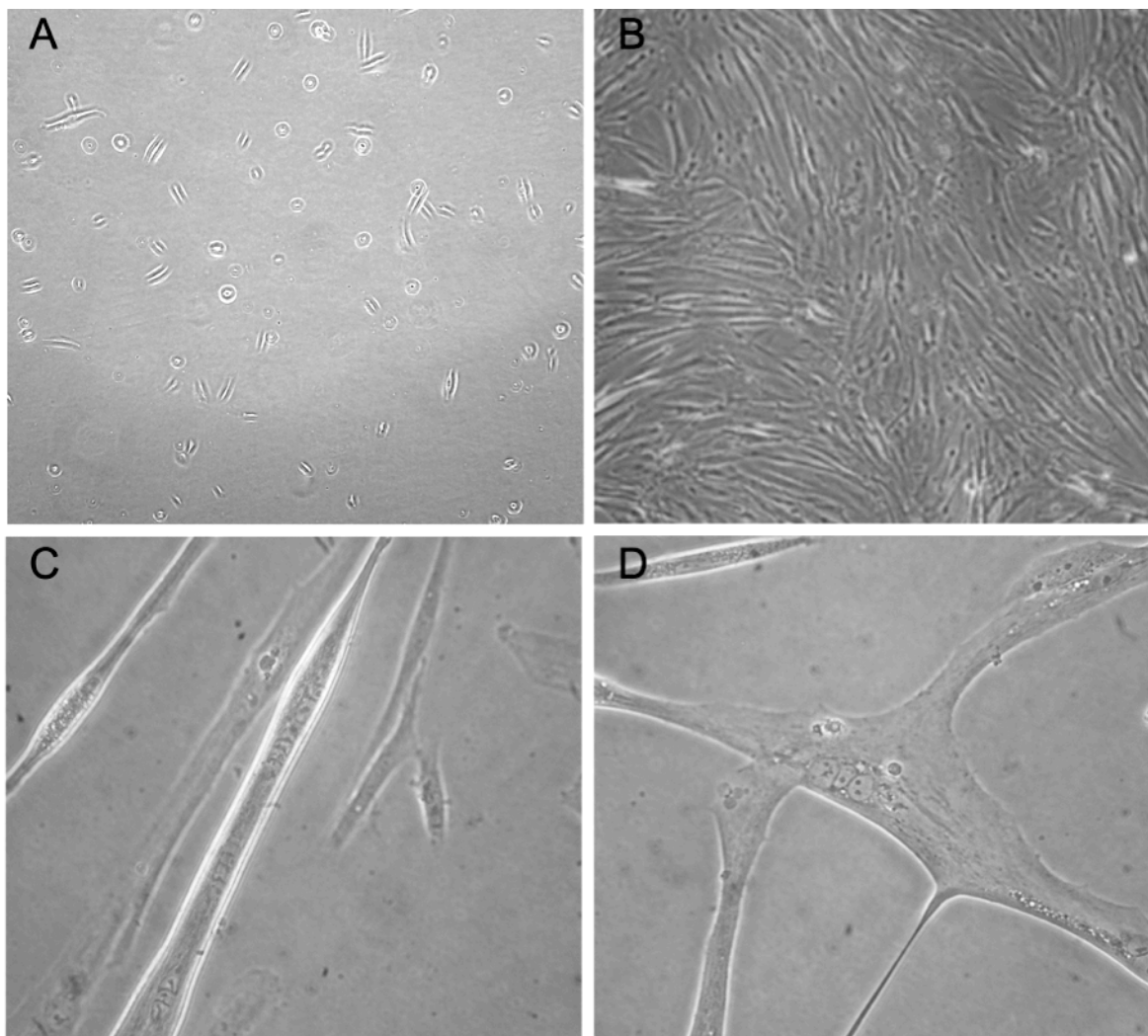
Kliniske parametre	Utrent n=6	Atlet n=6
Alder, år	26,8 ± 3,1	24,3 ± 0,8
Vekt, kg	93,5 ± 9,6	81,4 ± 3,2
KMI, kg/m ²	28,0 ± 2,7	23,9 ± 1,0
VO ₂ maks, ml/kg/min	41,1 ± 4,0	64,9 ± 1,8**
Fibertype 1, %	49,8 ± 2,8	54,3 ± 3,9
Fibertype 2, %	50,2 ± 2,8	45,7 ± 3,9
Kroppsfett, % InBody (n _{utrent} =4)	22,8 ± 3,5	10,3 ± 1,2**
Watt/kroppsvekt, watt/kg (n _{utrent} =5)	2,7 ± 0,2	4,8 ± 0,2**
Fettsyreoksidasjon ved RER 60 % belastning, %	19,3 ± 4,3	19,4 ± 5,3
Glukoseoksidasjon ved RER 60 % belastning, %	80,7 ± 4,3	80,6 ± 5,3
Borgs skala ved 75 % belastning	17,3 ± 0,7	16,7 ± 0,4
Laktat, mM	8,3 ± 0,6	10,3 ± 0,5*
fS-Glukose, mM	5,3 ± 0,1	4,9 ± 0,2*
fS-TAG, mM	1,2 ± 0,3	1,4 ± 0,4
S-HDL, mM	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1
S-LDL, mM	3,1 ± 0,4	2,6 ± 0,3

3.1.1 Korrelasjoner mellom ulike *in vivo*-data

VO₂maks korrelerte positivt med laktatkonsentrasjonen ved oppnådd VO₂maks (p=0,895, p<0,01, n=12). Det var ingen signifikant sammenheng mellom forsøkspersonenes VO₂maks og biopsiens fibertypefordeling (p=0,371, p=0,236, n=12). Videre var det en positiv korrelasjon mellom fysisk kapasitet per kroppsvikt (watt/kroppsvikt) og VO₂maks (p=0,835, p=0,001, n=11). I tillegg stod høyere fastende serum-glukose i sammenheng med lavere VO₂maks (p=-0,663, p=0,02, n=12). Kroppsfett (%) InBody korrelerte negativt med VO₂maks (p=-0,806, p=0,005, n=10). Videre var det negative korrelasjoner mellom serum-LDL og henholdsvis RER v/60 % (p=-0,597, p=0,04, n=12) og glukoseoksidasjon ved RER 60 % (p=-0,597, p=0,04, n=12). Det ble observert positiv korrelasjon mellom serum-LDL og fettsyreoksidasjon ved RER ved 60 % belastning (p=0,597, p=0,04, n=12). Resultatene viste tendens til positiv korrelasjon mellom VO₂maks og serum-HDL (p=0,541, p=0,07, n=12).

3.2 Celledyrking

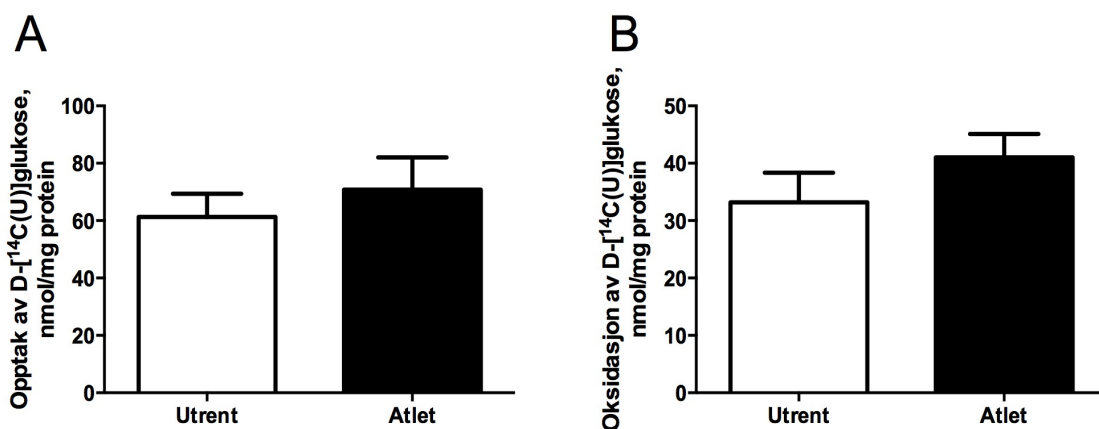
Celledyrkingsforløpet fra utsåing av myoblaster (aktiverte satelittceller) til flerkjernede myotuber benyttet til forsøk er presentert i figur 3.1. Det ble ikke observert morfologiske endringer som følge av de ulike behandlingene nevnt i avsnitt 2.5.3.



Figur 3.1: Forløpet fra skjelettmuskelceller (myoblaster) til differensierte skjelettmuskelfibre (myotuber). Figuren viser celledyrkningsprosessen fra qPCR forsøkene. Bildene ble tatt av donor 13 fra passasje 2 (AT13, p2), tilhørende atletgruppen. A) Adherente skjelettmuskelceller etter 24 timer i utsåingsmedium, før bytte til proliferasjonsmedium. Bildet ble tatt med 10x forstørring. B) Omtrent 80 % konfluente skjelettmuskelceller etter syv dager i proliferasjonsmedium, før bytte til differensieringsmedium. Bildet ble tatt med 10x forstørring. C) Cellene har differensiert til flerkjernede myotuber. Bilde av skjelettmuskelcellene etter tre dager i differensieringsmedium. Bildet ble tatt med 40x forstørring. D) Bilde av differensierte flerkjernede myotuber etter syv dager i differensieringsmedium, rett før forsøk i henhold til substratoksidasjonsmetoden. Bildet ble tatt med 40x forstørring.

3.3 Glukosemetabolisme i myotuber fra atletgruppen sammenlignet med myotuber fra utrentgruppen

Tidligere studier *in vivo* har vist at trening kan bedre glukosemetabolismen [33, 34], og det er blant annet vist høyere glukoseopptak i biopsimateriale [33, 92] og i myotuber [93] hos godt trente individer sammenlignet med utrente. I denne studien var det derfor ønskelig å undersøke om glukosemetabolisme i myotuber var forskjellig for atlet- og utrentgruppen. [^{14}C]glukose ble benyttet i substratoksidasjonsmetoden til å måle oksidasjon (CO_2) og celleassosiert radioaktivitet (CA), og ut ifra disse målingene ble opptak ($\text{CO}_2 + \text{CA}$) og oksidasjon (CO_2) av glukose i myotuber fra hver donor beregnet. Som vist i figur 3.2 A og B var det ingen signifikante forskjeller for henholdsvis glukoseopptak og -oksidasjon i myotubene fra de to gruppene. Det var heller ingen forskjell i celleassosiert (CA) glukose for myotuber fra atlet- og utrentgruppen (data ikke presentert). I tillegg ble det undersøkt hvor stor andel av glukose som henholdsvis ble oksidert ($\text{CO}_2/(\text{CO}_2 + \text{CA})$) og akkumulert ($\text{CA}/(\text{CO}_2 + \text{CA})$) i forhold til andel glukose som ble tatt opp av cellene. Disse parameterne viste heller ingen forskjeller for celler fra atlet- og utrentgruppen (data ikke presentert).

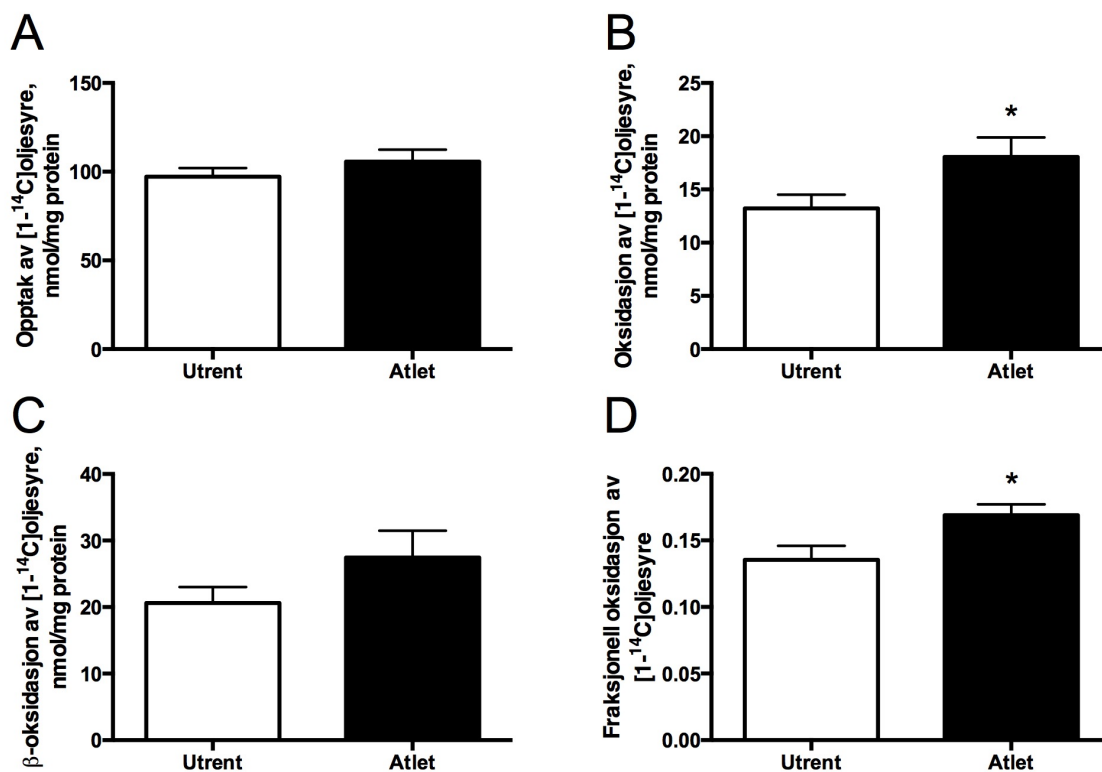


Figur 3.2: Glukosemetabolisme i myotuber fra atletgruppen sammenlignet med myotuber fra utrentgruppen. Myotuber ble inkubert i fire timer med 200 μM [^{14}C]glukose ved 37 °C, 5 % CO_2 . Opptak ($\text{CO}_2 + \text{CA}$) og oksidasjon (CO_2) av glukose ble beregnet som beskrevet i avsnitt 2.6. A) Opptak ($\text{CO}_2 + \text{CA}$). B) Oksidasjon (CO_2). Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra seks uavhengige forsøk i hver gruppe (n=6).

3.4 Lipidmetabolisme i myotuber fra atletgruppen sammenlignet med myotuber fra utrentgruppen

Utholdenhetstrening er vist å øke både opptak og oksidasjon av fettsyrer *in vivo* [25, 69, 94]. På bakgrunn av dette, i tillegg til atletparadokset beskrevet i avsnitt 1.5, var det ønskelig å undersøke metabolismen av oljesyre *in vitro* med hensyn på forskjeller mellom myotuber fra

atlet- og utrentgruppen. Det foreligger lite kunnskap med hensyn på omsetning av IMTG, og det var derfor ønskelig å undersøke fettsyremetabolismen i myotuber fra de to gruppene. Substratoksidasjonsmetoden og ASM ble benyttet til å bestemme opptak ($\text{CO}_2 + \text{ASM} + \text{CA}$), oksidasjon (CO_2) og β -oksidasjon (ASM) av $100 \mu\text{M}$ [^{14}C]oljesyre. Det var ingen forskjell i opptaket av oljesyre etter fire timer for myotuber fra atletgruppen sammenlignet med celler i utrentgruppen (figur 3.3 A). Akkumulering (CA) av oljesyre etter fire timer var heller ikke forskjellig mellom myotuber fra atlet- og utrentgruppen (data ikke presentert). Oksidasjon av oljesyre var derimot signifikant høyere i myotuber fra atletgruppen sammenlignet med celler i utrentgruppen (figur 3.3 B). Det var videre ingen forskjell i β -oksidasjon for gruppene (figur 3.3 C). Fraksjonell oksidasjon ($\text{CO}_2/(\text{CO}_2 + \text{ASM} + \text{CA})$) som viser andel CO_2 produsert i forhold til opptak av oljesyre var signifikant høyere for myotuber fra atletgruppen sammenlignet med utrentgruppen (figur 3.3 D). Derimot viste ikke $400 \mu\text{M}$ oljesyre noen signifikante forskjeller for myotuber fra atlet- og utrentgruppene verken med hensyn på opptak, oksidasjon, β -oksidasjon og fraksjonell oksidasjon ($\text{CO}_2/(\text{CO}_2 + \text{ASM} + \text{CA})$) - data ikke presentert).

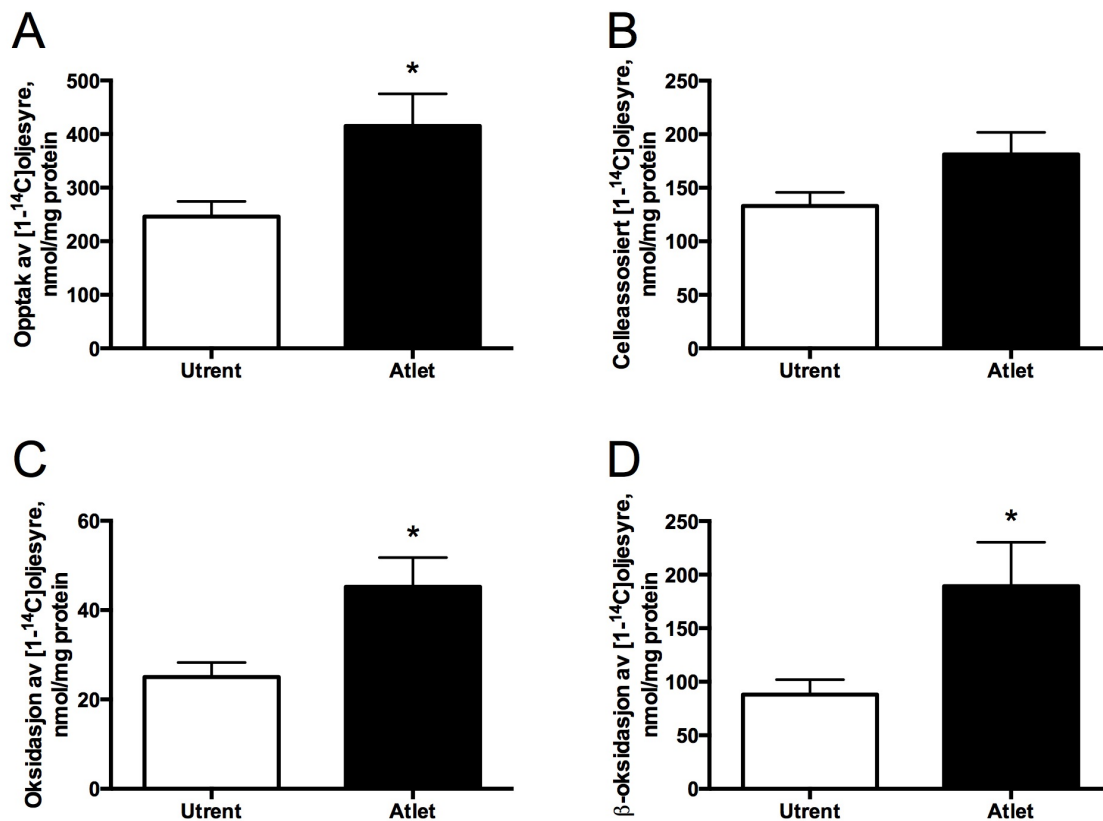


Figur 3.3: Lipidmetabolisme i myotuber fra atletgruppen sammenlignet med myotuber fra utrentgruppen. Ved bruk av substratoksidasjonsmetoden ble energimetabolismen av $100 \mu\text{M}$ [^{14}C]oljesyre bestemt etter inkubering i fire timer ved 37°C , 5 % CO_2 . A) Opptak ($\text{CO}_2 + \text{ASM} + \text{CA}$). B) Oksidasjon (CO_2). C) β -oksidasjon (ASM). D) Fraksjonell oksidasjon ($\text{CO}_2/(\text{CO}_2 + \text{ASM} + \text{CA})$). Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra seks uavhengige forsøk i hver gruppe ($n=6$). * $p<0,05$ vs. utrent.

Resultater

Lipidmetabolismen i myotuber fra begge gruppene (totalt 12 uavhengige forsøk) ble undersøkt ved henholdsvis tilstedeværelse (akuttbehandling) i fire timer og forbehandling i 24 timer av myotubene med 100 μM og 400 μM [^{14}C]oljesyre. På bakgrunn av at det ikke ble funnet forskjeller mellom gruppene i respons verken med hensyn på tid eller konsentrasjon ble dataene slått sammen og analysert ved en blandet modell-analyse.

Figur 3.4 A og B viser at oljesyreopptaket var høyere i myotuber fra atletgruppen enn i myotuber fra utrentgruppen etter 28 timer, mens det var tendens til det samme for celleassosiert oljesyre i 28 timer ($p=0,06$). Videre var også oljesyreoksidasjonen etter fire timer høyere i myotuber fra atletgruppen sammenlignet med celler i utrentgruppen etter forbehandling med oljesyre i 24 timer (figur 3.4 C). I tillegg var β -oksidasjonen etter 24 timer høyere for myotuber fra atletgruppen enn celler fra utrentgruppen (figur 3.4 D).

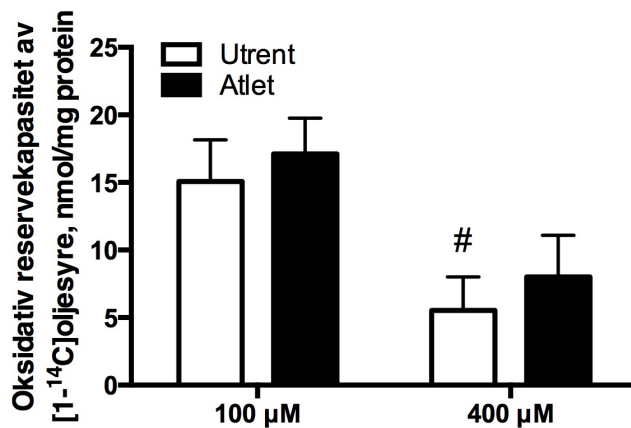


Figur 3.4: Effekter på fettsyremetabolismen etter forbehandling med oljesyre i 24 timer. Resultatene er presentert av sammenslåtte data fra to ulike konsentrasjoner av oljesyre (100 μM og 400 μM) for hver donor. Oljesyremetabolisme i myotuber ble bestemt i fire timer etter forbehandling med [^{14}C]oljesyre i 24 timer. A) Opptak ($\text{CO}_2 + \text{ASM} + \text{CA}$) i 28 timer. B) Celleassosiert (CA) i 28 timer. C) Oksidasjon (CO_2) i fire timer etter forbehandling i 24 timer. D) β -oksidasjon (ASM) i 24 timer. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra seks uavhengige forsøk i hver gruppe ($n=6$). * $p < 0,05$ vs. utrent.

3.5 Oksidativ reservekapasitet

Mitokondriell oksidativ reservekapasitet ble bestemt ved å benytte en mitokondriell frikobler, FCCP. Differansen mellom oljesyreoksidasjon etter FCCP-behandling og basal oksidasjon av oljesyre beskriver oksidativ reservekapasitet. Det er ikke kjent at denne parameteren er undersøkt på denne måten i myotuber fra to grupper inndelt etter VO_2 maks.

Oksidativ reservekapasitet av myotubene var imidlertid ikke signifikant forskjellig mellom gruppene (figur 3.5), og dette var tilfellet for oksidasjon av både 100 μM og 400 μM oljesyre i fire timer. Myotuber fra atletgruppen viste ikke forskjell i oksidativ reservekapasitet av oljesyreoksidasjon ved ulike konsentrasjoner, i motsetning til myotuber fra utrentgruppen som viste lavere oksidativ reservekapasitet ved oksidasjon av 400 μM sammenlignet med 100 μM oljesyre (figur 3.5).



Figur 3.5: Oksidativ reservekapasitet.

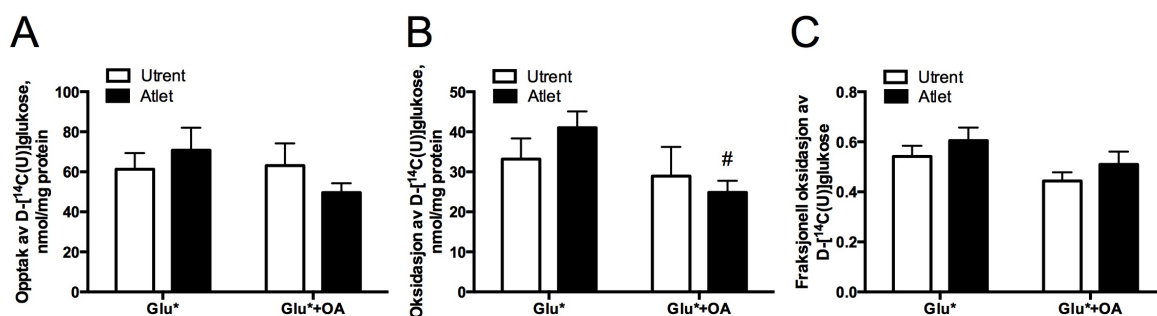
Oksidasjon av 100 μM og 400 μM $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre i myotuber ble bestemt i fire timer med eller uten tilstedeværelse av 1 μM FCCP. Oksidativ reservekapasitet av oljesyre for myotuber ble bestemt som differansen med og uten FCCP-behandling som beskrevet i avsnitt 2.9. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra seks uavhengige forsøk i hver gruppe ($n=6$). # $p<0,05$ vs. 100 μM .

3.6 Metabolsk fleksibilitet

In vitro-parameterne suppresjon, adapterbarhet og substratregulert fleksibilitet tidligere beskrevet i litteraturen [95, 96], ble bestemt for myotuber fra atlet- og utrentgruppen. Parameterne er tidligere forklart i avsnitt 1.7. ASM ble ikke tatt med i disse beregningene for oljesyreoksidasjon, og substratopptak ble bestemt som $\text{CO}_2 + \text{CA}$, mens oksidasjon ble bestemt som CO_2 for både oljesyre- og glukosemetabolismen [96]. Lignende studier i myotuber som sammenligner godt trente mot utrente individer er ikke beskrevet i litteraturen, men det er tidligere rapportert at metabolsk fleksibilitet *in vivo* er gjenspeilet i myotuber [96]. Resultatene vil kunne gi en indikasjon på om en treningstilstand alene har innvirkning på metabolsk fenotype.

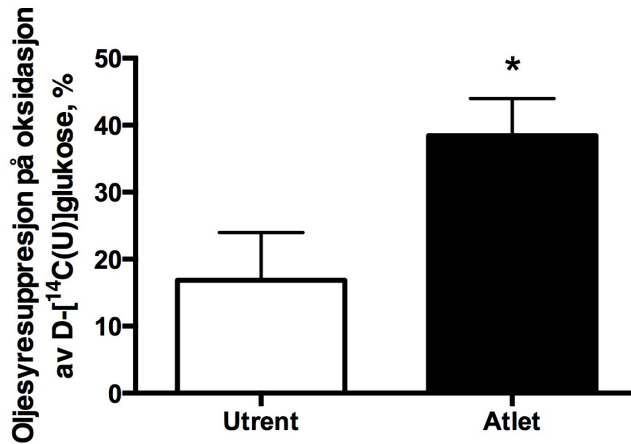
3.6.1 Suppresjonseffekt av oljesyre på glukosemetabolismen

Myotuber ble akuttbehandlet med 100 μM ikke-radioaktiv oljesyre for å undersøke hvilke effekter dette hadde på metabolismen av 200 μM D- ^{14}C glukose. Ikke-radioaktiv oljesyre tilsatt det radioaktive mediet ble benyttet i substratoksidasjonsmetoden. Som vist i figur 3.6 ble det observert en tendens til reduksjon i opptak for myotubene i atletgruppen som resultat av tilstedeværelse (akuttbehandling) av 100 μM ikke-radioaktiv oljesyre ($p=0,06$), men dette var ikke tilfellet for utrentgruppen. Videre var oksidasjon av glukose signifikant redusert i myotuber fra atletgruppen som følge av tilstedeværelse av ikke-radioaktiv oljesyre, hvilket ikke var tilfellet for celler fra utrentgruppen (figur 3.6 B). Fraksjonell glukoseoksidasjon ($\text{CO}_2/\text{CO}_2 + \text{CA}$) var ikke påvirket av tilstedeværelse av 100 μM ikke-radioaktiv oljesyre (figur 3.6 C).



Figur 3.6: Effekter av oljesyre på glukosemetabolismen. Opptak ($\text{CO}_2 + \text{CA}$) og oksidasjon (CO_2) av 200 μM ^{14}C glukose i myotuber ble bestemt etter fire timer ved tilstedeværelse av 100 μM ikke-radioaktiv oljesyre ($\text{Glu}^* + \text{OA}$) eller uten oljesyre (Glu^*). A) Opptak ($\text{CO}_2 + \text{CA}$) av ^{14}C glukose. B) Oksidasjon (CO_2) av ^{14}C glukose. C) Fraksjonell oksidasjon ($\text{CO}_2/\text{CO}_2 + \text{CA}$) av ^{14}C glukose. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra seks uavhengige forsøk i hver gruppe ($n=6$). # $p < 0,05$ vs. Glu^* .

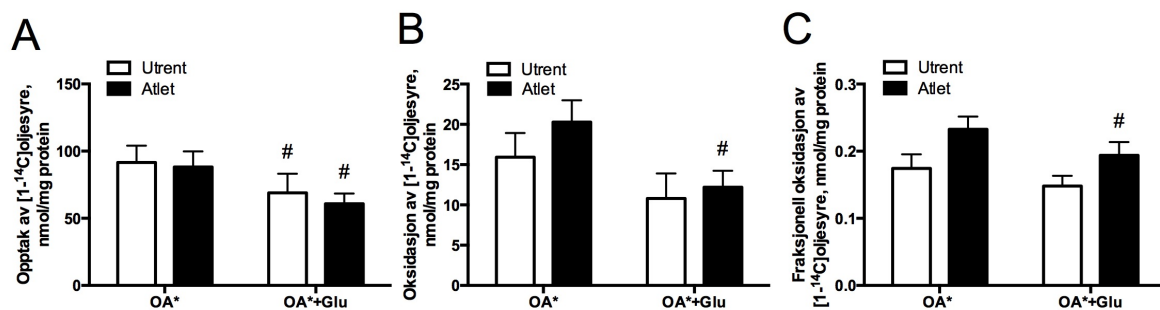
Resultatene viste høyere oljesyresuppresjon i myotuber fra atletgruppen sammenlignet med utrentgruppen etter akuttbehandling med 100 μM ikke-radioaktiv oljesyre (figur 3.7).



Figur 3.7: Oljesyresuppresjon. Oksidasjon (CO_2) av 200 μM [¹⁴C]glukose i myotuber ved tilstedeværelse av 100 μM ikke-radioaktiv oljesyre ble målt ved hjelp av substratoksidasjonsmetoden. Oljesyresuppresjon (%) ble beregnet som beskrevet i avsnitt 2.9. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra seks uavhengige forsøk i hver gruppe (n=6). *p<0,05 vs. utrent.

3.6.2 Suppresjonseffekter av glukose på oljesyremetabolismen

På samme måte som beskrevet i avsnitt 3.6.1 ble metabolisme av [¹⁴C]oljesyre bestemt etter tilstedeværelse (akuttbehandling) av 200 μM ikke-radioaktiv glukose for å se hvilke effekter dette hadde på metabolismen av [¹⁴C]oljesyre. Ved tilstedeværelse av ikke-radioaktiv glukose var opptaket av [¹⁴C]oljesyre redusert i myotuber fra begge gruppene (figur 3.8 A). Derimot var oksidasjon og fraksjonell oksidasjon ($\text{CO}_2/\text{CO}_2+\text{CA}$) av [¹⁴C]oljesyre kun signifikant redusert i myotuber fra atletgruppen som følge av tilstedeværelse av ikke-radioaktiv glukose (figur 3.8 B og C). Det var imidlertid tendens til redusert oljesyreoksidasjon for myotuber fra utrentgruppen som følge av tilstedeværelse av ikke-radioaktiv glukose under trappingen (p=0,06 - figur 3.8 B).

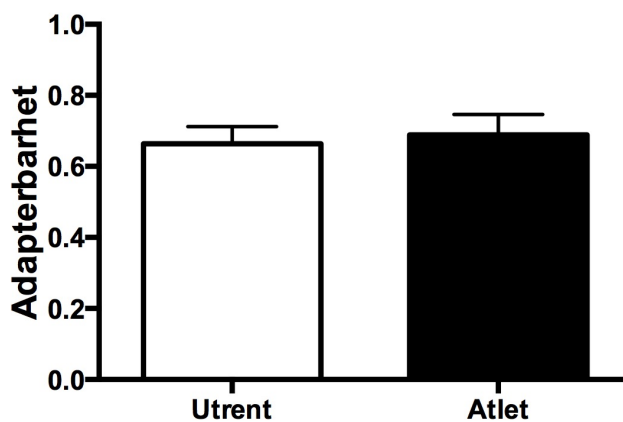


Figur 3.8. Effekter av glukose på oljesyremetabolismen. Opptak (CO_2+CA) og oksidasjon (CO_2) av [¹⁴C]oljesyre i myotuber ble bestemt etter fire timer med (OA*+Glu) eller uten (OA*) tilstedeværelse av 200 μM ikke-radioaktiv glukose. A) Oljesyreopptak (CO_2+CA). B) Oljesyreoksidasjon (CO_2). C) Fraksjonell oksidasjon ($\text{CO}_2/\text{CO}_2+\text{CA}$) av oljesyre. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra seks uavhengige forsøk i hver gruppe (n=6). #p<0,05 vs. OA*.

Glukosesuppresjon (%) på oljesyreoksidasjonen ble beregnet som beskrevet i avsnitt 2.9. Ved tilstedeværelse av 200 μM glukose var glukosesuppresjonen henholdsvis 32 ± 13 % for myotuber fra atletgruppen og 30 ± 14 % for myotuber fra utrentgruppen. Videre reduserte tilstedeværelse av 5 mM glukose til 32 ± 6 % reduksjon av oljesyreoksidasjonen for myotuber fra atletgruppen og 33 ± 13 % for myotuber fra utrentgruppen. Det var imidlertid ingen signifikante forskjeller i glukosesuppresjon (%) for gruppene verken ved 200 μM eller 5 mM glukose (data ikke presentert).

3.6.3 Adapterbarhet

Adapterbarhet ble opprinnelig beskrevet av Ukropcova et al. som evne til å øke fettsyreoksidasjonen ved økt tilgang på fettsyrer fra 5 μM til 100 μM fettsyre [96], mens parameteren beregnet i denne studien benyttes til å beskrive evne til å øke fettsyreoksidasjonen fra 100 μM til 400 μM . Adapterbarhet inngår i beskrivelsen av metabolsk fleksibilitet av skjelettmuskelen, og det var ønskelig å undersøke om parameteren var ulik mellom atlet- og utrentgruppen. Figur 3.9 viser at det ikke var forskjell for myotuber fra atlet- og utrentgruppen med hensyn på adapterbarhet (utregning vist i figurtekst 3.9).

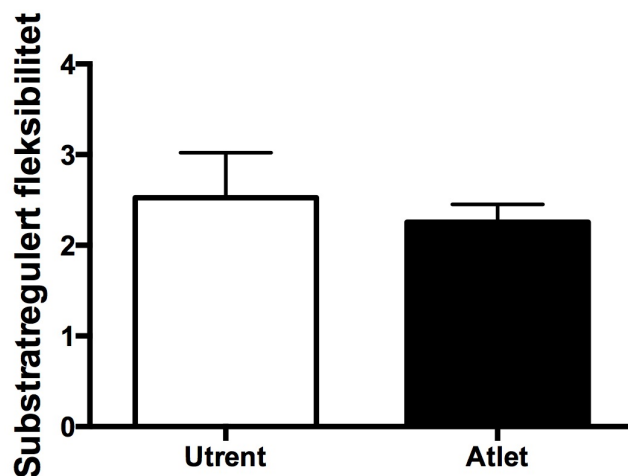


Figur 3.9: Adapterbarhet. Oksidasjon (CO_2) av 100 μM og 400 μM [^{14}C]oljesyre i myotuber ble bestemt med substratoksidasjonsmetoden. Parameteren ble beregnet som beskrevet i avsnitt 2.9. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra seks uavhengige forsøk i hver gruppe ($n=6$).

3.6.4 Substratregulert fleksibilitet

Substratregulert fleksibilitet beskriver hvordan skjelettmuskelcellene evner å øke fettsyreoksidasjonen ved skifte fra en postprandialsituasjon (lav tilgang på fettsyrer og høy tilgang på glukose) til en fastesituasjon (god tilgang på fettsyrer med lite glukose tilstede) [95]. Parameteren ble bestemt som en modifisert formel (avsnitt 2.9) tidligere beskrevet av

Hessvik et al. [95]. Som vist i figur 3.10 var det ingen signifikant forskjell mellom gruppene med hensyn på substratregulert fleksibilitet.



Figur 3.10: Substratregulert fleksibilitet. Oksidasjon (CO_2) av 100 μM og 400 μM $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre i myotuber ved tilstedeværelse av 5 mM glukose etter fire timer ble bestemt med substratoksidasjonsmetoden. Substratregulert fleksibilitet ble beregnet som beskrevet i avsnitt 2.9. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra seks uavhengige forsøk i hver gruppe ($n=6$).

3.7 Behandlingseffekter på skjelettmuskelceller

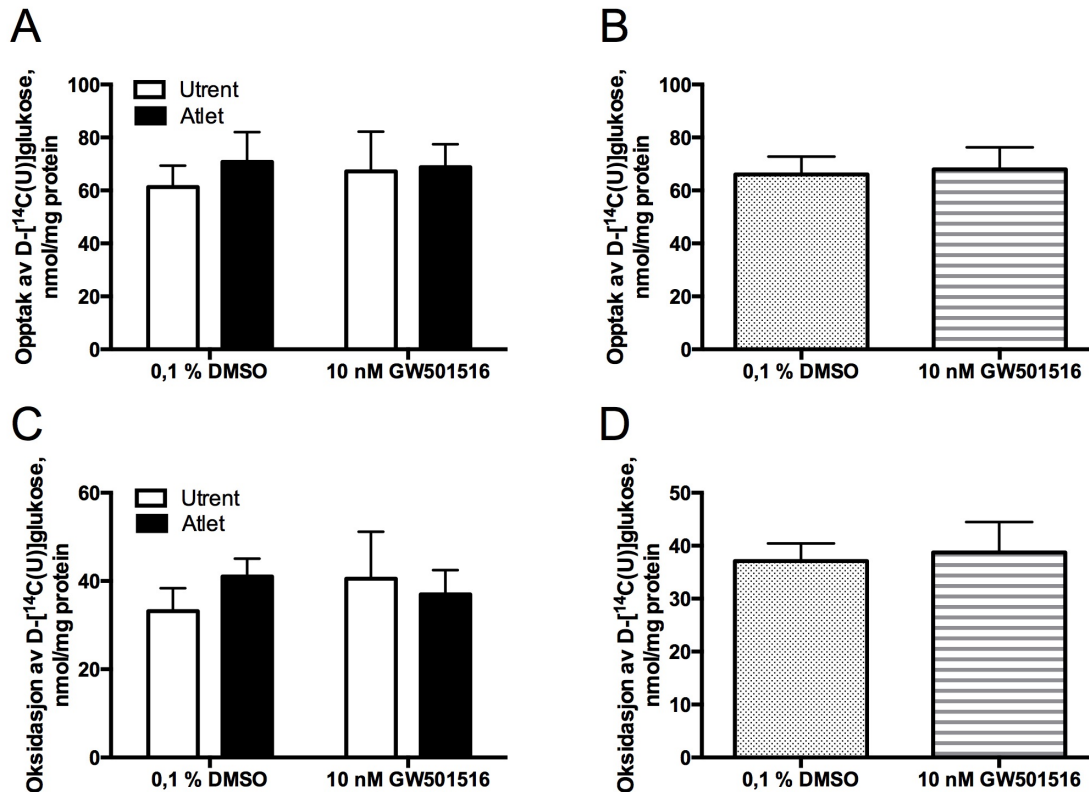
Myotuber fra atlet- og utrentgruppen ble behandlet med PPAR δ -agonisten GW501516, LXR-agonisten Tularik og 4-tiafettsyreanalogen TTP i den siste delen av differensieringsperioden for å se hvilke effekter disse substansene hadde på metabolismen. Effekter av behandlingene er oppsummert i tabell i appendiks 8.

3.7.1 Effekter av PPAR δ -agonisten GW501516 på glukosemetabolismen

Myotubene ble behandlet med GW501516 for å undersøke effekter av substansen på metabolismen i myotuber fra unge og godt trente individer. Chen et al. viste at GW stimulerte utholdenhetskapasiteten hos mus, og at substansen gav ytterligere stimulering av utholdenhetskapasiteten som tillegg til trening [16]. På bakgrunn av dette var det derfor ønskelig å undersøke om substansen hadde lignende effekter som utholdenhetstrening, i tillegg til om GW501516 viste en additiv effekt til utholdenhetstrening i myotuber fra atlet- og utrentgruppen. Feng et al. observerte redusert glukosemetabolisme i myotuber som resultat av GW-behandling [29].

Myotuber fra begge gruppene ble behandlet med 10 nM GW501516 eller 0,1 % DMSO (som kontroll) i de fire siste døgnene av differensieringsperioden. Opptak ($\text{CO}_2 + \text{CA}$) og oksidasjon (CO_2) av 200 μM [^{14}C]glukose ble bestemt ved bruk av substratoksidasjonsmetoden.

Glukoseopptaket var ikke påvirket av GW-behandlingen sammenlignet med ubehandlede celler verken for myotuber fra atlet- eller utrentgruppen (figur 3.11 A), og dette var også tilfellet ved å se på dataene samlet for begge gruppene (figur 3.11 B). Figur 3.11 C og D viser at heller ikke glukoseoksidasjonen var påvirket av GW-behandlingen i verken myotuber fra atlet- eller utrentgruppen, og at det samme var tilfellet for begge gruppene samlet. På samme måte hadde heller ikke GW501516 påvirkning på akkumulering av glukose (CA) i myotuber fra atlet- og utrentgruppen, og det samme var tilfellet for gruppene samlet (data ikke presentert). Glukosemetabolismen var ikke forskjellig mellom myotuber fra de to gruppene etter PPAR-stimulering (figur 3.11 A og C).



Figur 3.11: Effekter av PPAR δ -agonisten GW501516 på glukosemetabolismen. I de siste fire døgnene av differensieringsperioden ble myotuber behandlet med 10 nM GW501516 eller 0,1 % DMSO. Opptak ($\text{CO}_2 + \text{CA}$) og oksidasjon (CO_2) av 200 μM [^{14}C]glukose ble bestemt ved bruk av substratoksidasjonsmetoden. A) Opptak for atlet- og utrentgruppen. B) Opptak for begge gruppene samlet. C) Oksidasjon for atlet- og utrentgruppen. D) Oksidasjon for begge gruppene samlet. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM, A og C: fra 12 uavhengige forsøk for hver behandling ($n=12$); B og D: fra seks uavhengige forsøk i hver gruppe ($n=6$).

3.7.2 Effekter av PPAR δ -agonisten GW501516 på oljesyremetabolismen

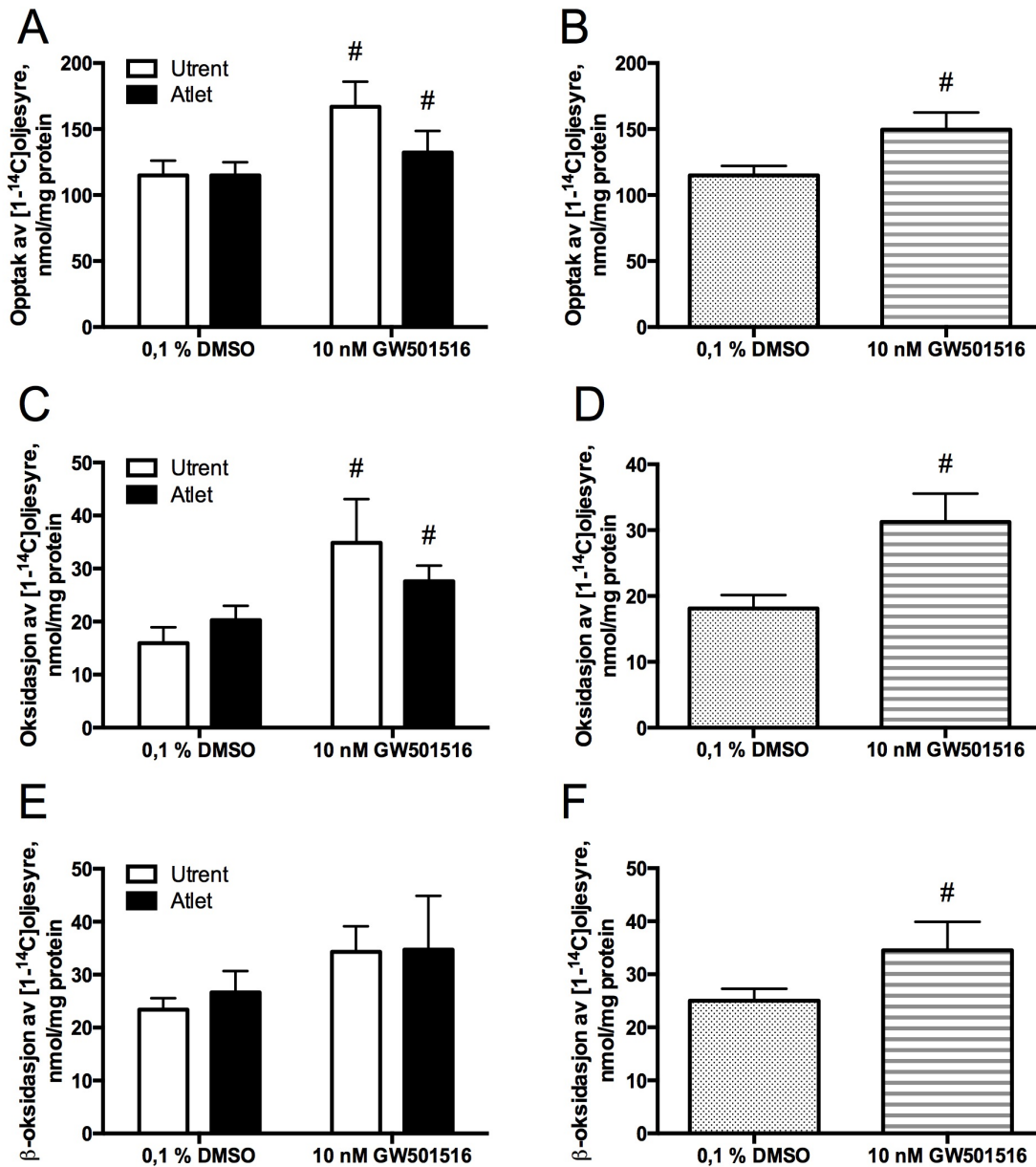
Myotubene ble behandlet med GW501516 for å undersøke effekter av substansen på oljesyremetabolismen av samme hensikt som nevnt i avsnitt 3.7.1. Som resultat av GW-behandling er det tidligere observert økt oljesyremetabolisme i myotuber [29].

Myotuber fra begge gruppene ble behandlet med 10 nM GW501516 og 0,1 % DMSO i de fire siste døgnene av differensieringsperioden. Opptak ($\text{CO}_2 + \text{ASM} + \text{CA}$), oksidasjon (CO_2) og β -oksidasjon (ASM) av [^{14}C]oljesyre ble bestemt ved bruk av substratoksidasjonsmetoden.

Figur 3.12 A viser at ble observert høyere opptak av oljesyre som følge av behandlingen for myotuber både i atlet- og utrentgruppen, i tillegg til at dette også var tilfellet ved å slå sammen data for gruppene (figur 3.12 B). Figur 3.12 C viser at oljesyreoksidasjonen også var høyere i myotuber behandlet med GW501516 både i atlet- og utrentgruppen, og denne effekten var naturlig nok også tilstede ved å slå sammen data for gruppene (figur 3.12 D). Videre var det ikke tendens til høyere β -oksidasjon for atletgruppen som resultat av GW-behandlingen, hvilket var tilfellet for utrentgruppen ($p=0,06$) (figur 3.12 E). Ved å slå

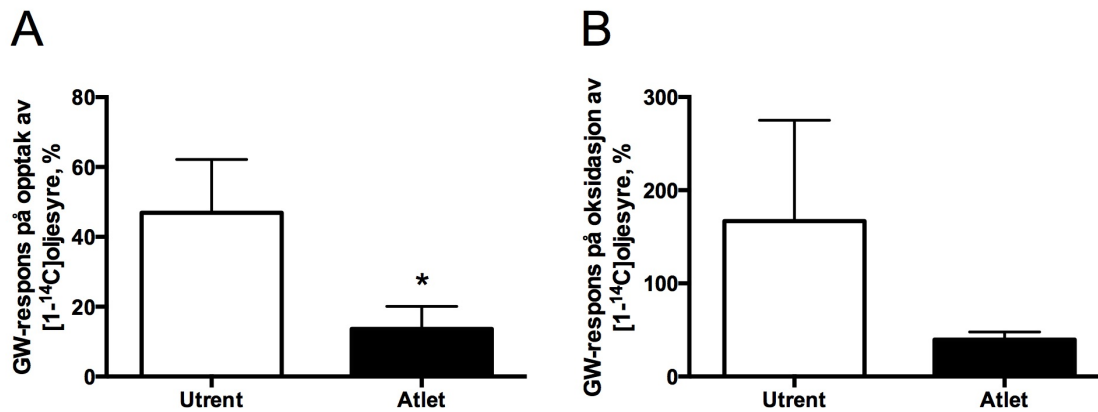
Resultater

sammen data for begge gruppene var β -oksidasjon signifikant høyere som følge av GW-behandlingen (figur 3.12 F). Oljesyremetabolismen var imidlertid ikke forskjellig mellom myotuber fra atlet- og utrentgruppen etter PPAR-stimulering (figur 3.12 A, C og E).



Figur 3.12: Effekter av PPAR δ -agonisten GW501516 på fettsyremetabolismen. I de siste fire døgnene av differensieringsperioden ble myotuber behandlet med 10nM GW501516 og 0,1 % DMSO. Opptak ($\text{CO}_2 + \text{ASM} + \text{CA}$), oksidasjon (CO_2) og β -oksidasjon (ASM) av 100 μM [1-¹⁴C]oljesyre ble bestemt ved bruk av substratoksidasjonsmetoden. A) Opptak for atlet- og utrentgruppen. B) Opptak for begge gruppene samlet. C) Oljesyreoksidasjon for atlet- og utrentgruppen. D) Oljesyreoksidasjon for begge gruppene samlet. E) β -oksidasjon av oljesyre for atlet- og utrentgruppen. D) β -oksidasjon av oljesyre for begge gruppene samlet. A, C og E: fra seks uavhengige forsøk for hver behandling (n=6); B, D og F: fra 12 uavhengige forsøk i hver gruppe (n=12). #p<0,05 vs. DMSO.

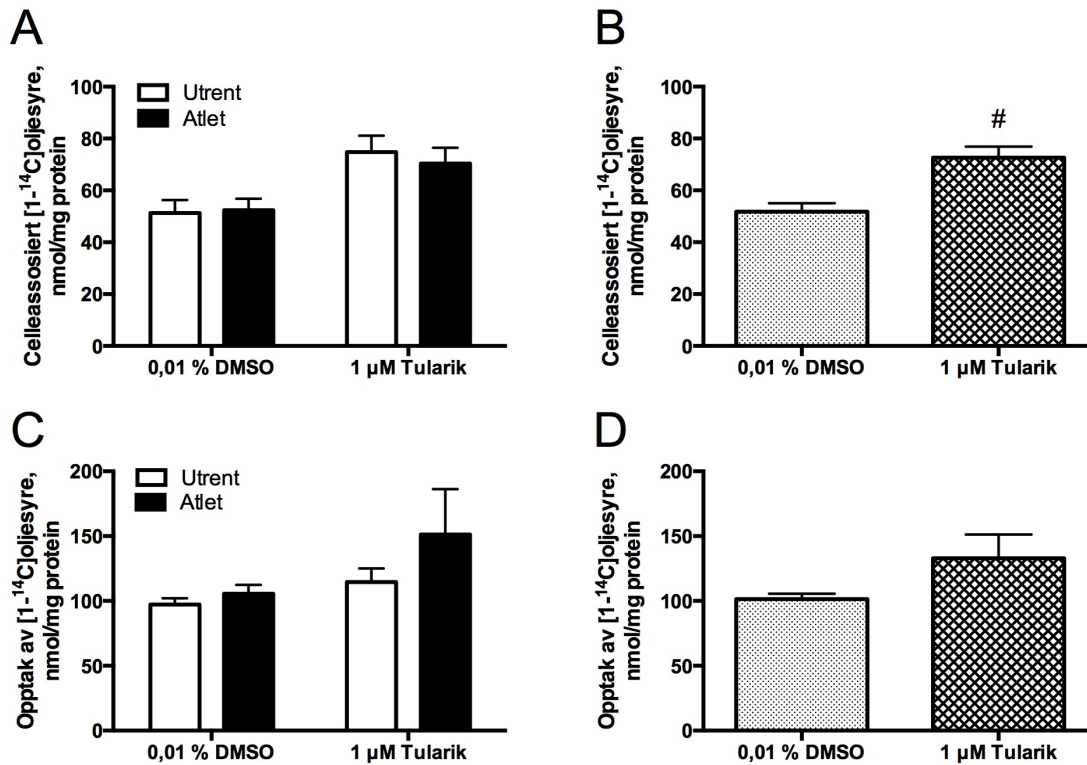
Myotuber fra atletgruppen viste lavere respons av GW-behandling på oljesyreopptaket sammenlignet med myotuber fra utrentgruppen (figur 3.13 A). Det ble i tillegg observert tendens til lavere GW-respons (%) på oljesyreoksidasjonen for myotuber fra atletgruppen sammenlignet med utrentgruppen ($p=0,09$ - 3.13 B).



Figur 3.13: GW-respons (%) på fetttsyremetabolismen. I de siste fire døgne av differensieringsperioden ble myotuber behandlet med 10 nM GW501516 eller 0,1 % DMSO. Opptak ($\text{CO}_2 + \text{ASM} + \text{CA}$) og oksidasjon (CO_2) av 100 μM $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre ble bestemt ved bruk av substratoksidasjonsmetoden. GW-respons (%) ble beregnet som $[(\text{OA} * \text{GW501516} - \text{OA} * 0,1 \% \text{ DMSO}) / \text{OA} * 0,1 \% \text{ DMSO}] \times 100\%$. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra seks uavhengige forsøk i hver gruppe ($n=6$). * $p < 0,05$ vs. utrent.

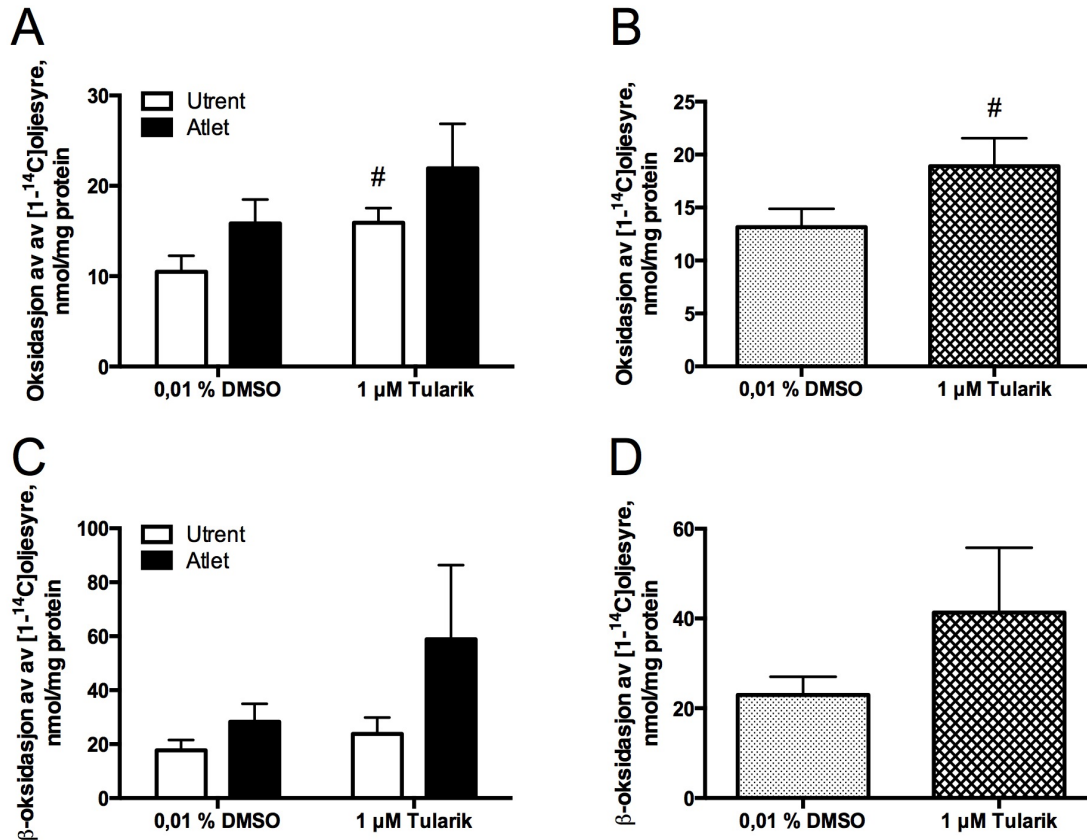
3.7.3 Effekter av LXR-agonisten Tularik (T0901317) på oljesyre-metabolismen

Det er tidligere vist at behandling med Tularik øker lipidmetabolismen i myotuber, og at effektene var større i myotuber fra type 2-diabetikere sammenlignet med celler fra friske, normalvektige forsøkspersoner [79]. Myotubene ble derfor behandlet med LXR-agonisten Tularik for å se hvilke effekter denne substansen hadde for godt trente og utrente individer, samt om effektene var forskjellige mellom gruppene. Myotuber ble behandlet med 1 μM Tularik eller 0,01 % DMSO (kontroll) i de siste fire døgne av differensieringsperioden. Som vist i figur 3.14 A hadde Tularik ingen effekt på oljesyreakkumulering (CA) i myotuber fra atletgruppen sammenlignet med kontroll, i motsetning til myotuber fra utrentgruppen som viste tendens til høyere oljesyreakkumulering (CA) etter behandling med Tularik ($p=0,06$). Ved å se på data for begge gruppene samlet var oljesyreakkumuleringen (CA) signifikant høyere etter behandling med Tularik (figur 3.14 B). Resultatene viste ingen signifikante effekter av Tularik på oljesyreopptaket verken for myotuber fra atlet- eller utrentgruppen (figur 3.14 C). Figur 3.14 D viser imidlertid at behandling av myotubene med 1 μM Tularik tenderte til høyere opptak av oljesyre sammenlignet med kontroll for begge gruppene samlet ($p=0,06$).



Figur 3.14: Effekter av LXR-agonisten Tularik (T0901317) på opptak av oljesyre. Myotuber ble behandlet med 1 μM Tularik eller 0,01 % DMSO i de fire siste døgnene av differensieringsperioden. Opptak ($\text{CO}_2 + \text{ASM} + \text{CA}$) og celleassosiert radioaktivitet (CA) av 100 μM [^{14}C]oljesyre ble beregnet ved bruk av substratoksidasjonsmetoden. A) Opptak ($\text{CO}_2 + \text{ASM} + \text{CA}$) for atlet- og utrentgruppen. B) Opptak ($\text{CO}_2 + \text{ASM} + \text{CA}$) for begge gruppene samlet. C) Celleassosiert radioaktivitet (CA) for atlet- og utrentgruppen. D) Celleassosiert radioaktivitet (CA) for begge gruppene samlet. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM, A og C fra seks uavhengige forsøk for hver gruppe ($n=6$); B og D: fra 12 uavhengige forsøk for begge gruppene samlet ($n=12$). # $p < 0,05$ vs. DMSO.

Figur 3.15 A viser at myotuber fra utrentgruppen viste signifikant høyere oljesyreoksidasjonen som resultat av behandling med Tularik, mens det kun var tendens til høyere oljesyreoksidasjon for myotuber fra atletgruppen som følge av behandlingen ($p=0,09$). Ved å slå sammen data for begge gruppene var oljesyreoksidasjonen høyere for myotuber behandlet med Tularik sammenlignet med kontroll (figur 3.15 B). β -oksidasjonen var ikke påvirket av Tularik-behandling sammenlignet med kontroll verken for myotuber fra atlet- eller utrentgruppen (figur 3.15 C). Figur 3.15 D viser at dette også var tilfellet ved å se på data for begge gruppene samlet.



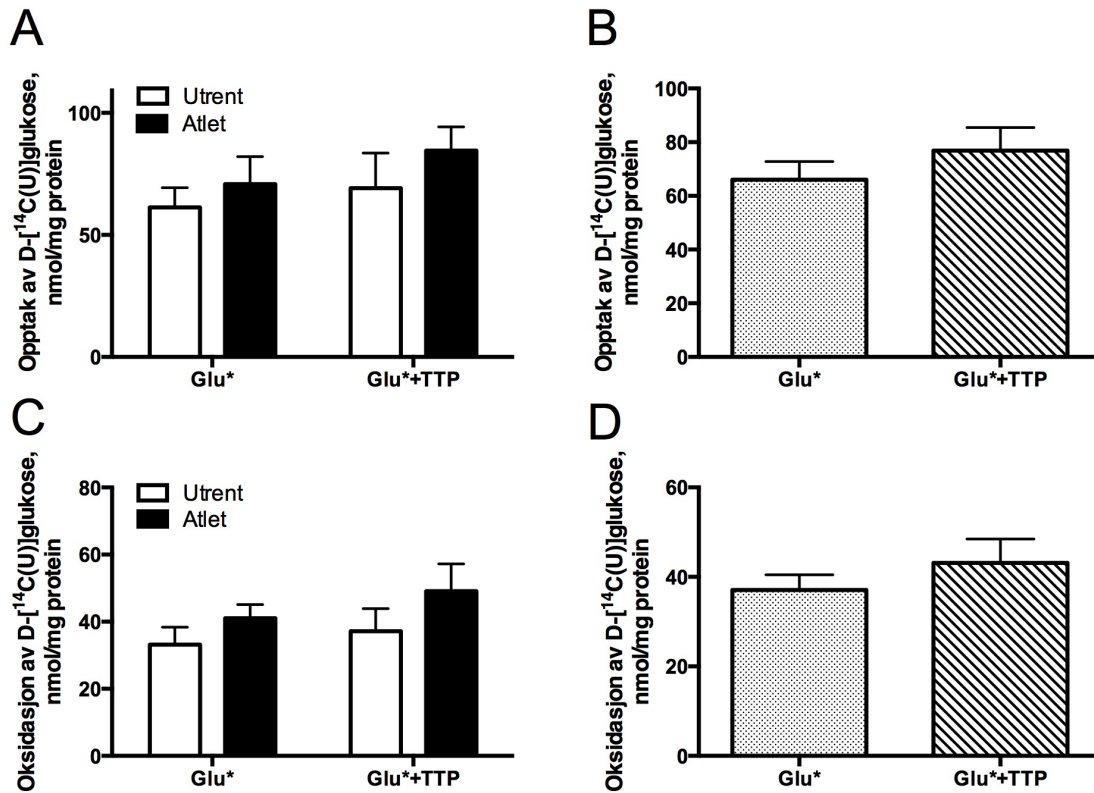
Figur 3.15: Effekter av LXR-agonisten Tularik (T0901317) på oksidasjon av oljesyre. Myotuber ble behandlet med 1 μM Tularik eller 0,01 % DMSO i de fire siste døgnene av differensieringsperioden. Oksidasjon (CO_2) og β -oksidasjon (ASM) av 100 μM $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre ble bestemt ved bruk av substratoksidasjonsmetoden. A) Oksidasjon (CO_2) for atlet- og utrentgruppen. B) Oksidasjon (CO_2) for begge gruppene samlet. C) β -oksidasjon (ASM) for atlet- og utrentgruppen. D) β -oksidasjon (ASM) for begge gruppene samlet. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM, A og C fra seks uavhengige forsøk for hver gruppe ($n=6$); B og D: fra 12 uavhengige forsøk for begge gruppene samlet ($n=12$). [#] $p < 0,05$ vs. DMSO.

3.7.4 Effekter av 4-tiafettsyreanalogen tetradecyltiopropionsyre (TTP)

TTP blokkerer fettsyreoksidasjonen og medfører lipidakkumulering i leverceller fra rotte [81, 82]. Det er ikke kjent om det er gjort studier på denne substansen i myotuber tidligere, og i denne studien ble TTP undersøkt som en potensiell testsubstans for å studere lipidakkumulering. Dermed ble det i større grad fokusert på behandlingseffekter av TTP enn forskjeller mellom gruppene. Hypotesen i forbindelse med denne studien (illustrert i figur 4.1) var at TTP ville fremme lipidakkumuleringen i skjelettmuskelceller, og at dette videre kunne forstyrre glukosemetabolismen i form av redusert glukoseopptak og -oksidasjon.

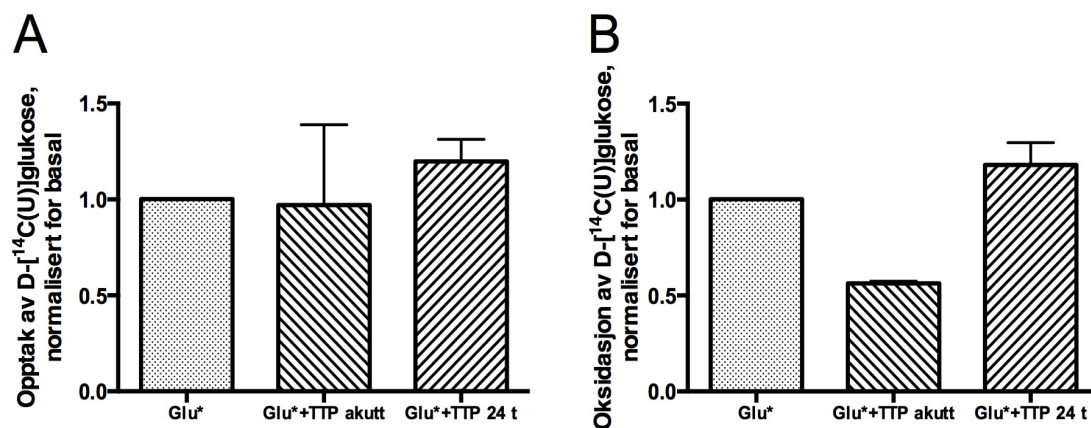
Effekter av TTP på glukosemetabolismen ble undersøkt ved at myotuber ble behandlet med eller uten 100 μM TTP i ett døgn før substratoksidasjonsmetoden ble benyttet til bestemmelse av metabolisme av 200 μM $[^{14}\text{C}]$ glukose i fire timer. TTP-behandlingen viste ingen påvirkning på opptaket av glukose, og dette var tilfellet ved å se på dataene gruppevis (figur

3.16 A) og for begge gruppene samlet (figur 3.16 B). Figur 3.16 C viser at behandling med TTP ikke resulterte i endret glukoseoksidasjon verken for myotuber fra atlet- eller utrentgruppen. Det samme var tilfellet ved å se på dataene samlet (figur 3.16 D).



Figur 3.16: Effekter av 4-tiafettsyreanalogen tetradecyltiopropionsyre (TTP) på glukosemetabolismen. Opptak (CO_2+CA) og oksidasjon (CO_2) av $200 \mu M$ $[^{14}C(U)]$ glukose ble bestemt i fire timer etter at myotuber var behandlet uten (Glu^*) eller med $100 \mu M$ TTP (Glu^*+TTP) i ett døgn før inkubering. A) Opptak (CO_2+CA) for atlet- og utrentgruppen. B) Opptak (CO_2+CA) for begge gruppene samlet. C) Oksidasjon (CO_2) for atlet- og utrentgruppen. D) Oksidasjon (CO_2) for atlet- og utrentgruppen. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM, A og C: fra seks uavhengige forsøk for hver behandling ($n=6$); B og D: fra 12 uavhengige forsøk i hver gruppe ($n=12$).

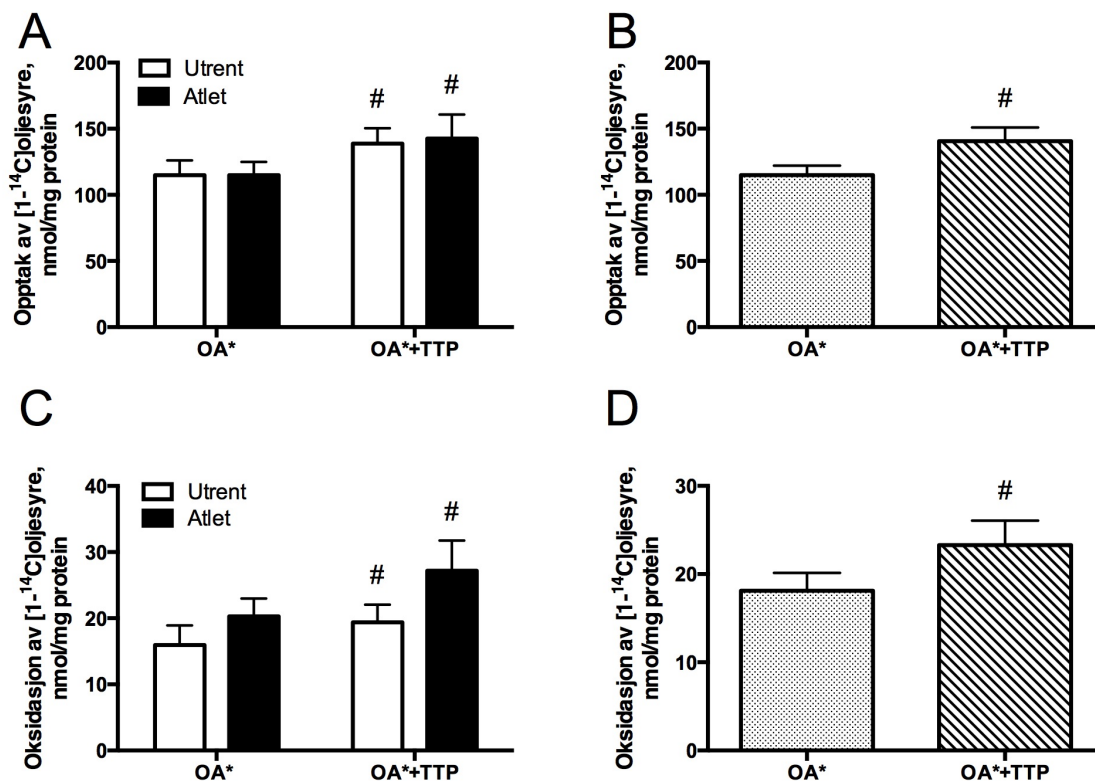
Det ble videre gjort to uavhengige forsøk der $100 \mu M$ TTP var tilstede under trapping i fire timer. Opptak (CO_2+CA) og oksidasjon (CO_2) av $200 \mu M$ $[^{14}C]$ glukose ble beregnet ved hjelp av substratoksidasjonsmetoden. Da forsøkene ble utført på to ulike tidspunkter ble dataene relatert til oksidasjonen av $[^{14}C]$ glukose. Som illustrert i figur 3.17 A var det ingen effekt på opptaket av glukose ved tilstedeværelse av TTP under inkuberingen i fire timer. Derimot viste tilstedeværelse av TTP redusert oksidasjon av glukose sammenlignet med både TTP-behandling i det siste døgnet av differensieringsperioden og uten TTP tilstede (figur 3.17 B).



Figur 3.17: Effekter på glukosemetabolismen ved ulike tidslengder av TTP-behandling. Metabolisme av 200 μ M [¹⁴C(U)]glukose i myotuber ble bestemt uten (Glu*), med tilstedeværelse av 100 μ M TTP under trapping (Glu* + TTP akutt) eller tilstedeværelse av 100 μ M TTP i de siste 24 timene av differensieringsperioden (Glu* + TTP 24 t). A) Opptak (CO₂+CA). B) Oksidasjon (CO₂). Resultatene er normalisert for Glu*, og presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra 12 uavhengige forsøk for TTP 24 timer (n=12) og to uavhengige forsøk for TTP akutt (n=2). Statistikk ble ikke beregnet da n=2 for TTP akutt.

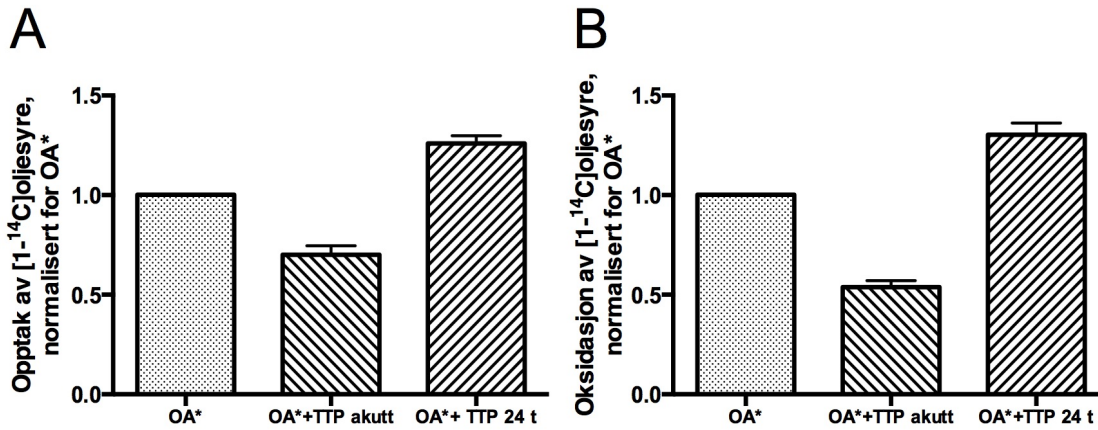
Resultater

Videre ble effekter av TTP på oljesyremetabolismen undersøkt. Myotuber ble behandlet med eller uten 100 μM TTP i det siste døgnet av differensieringsperioden, og substratoksidasjonsmetoden ble benyttet til å bestemme metabolismen av 100 μM [^{14}C]oljesyre. Som vist i figur 3.18 A resulterte TTP-behandlingen til høyre oljesyreopptak både for atlet- og utrentgruppen, og dette var også tilfellet ved å se på data fra begge gruppene samlet (figur 3.18 B). På samme måte var oljesyreoksidasjonen økt som resultat av behandling med TTP både for myotuber fra atlet- og utrentgruppen (figur 3.18 C). De samme observasjonene ble også sett ved å se på data for begge gruppene samlet (figur 3.18 D).



Figur 3.18: Effekter av 4-tiafettsyreanalogen tetradecyltiopropionsyre (TTP) på fettysremetabolismen. Metabolisme av 100 μM [^{14}C]oljesyre ble bestemt i fire timer for myotuber behandlet med (OA*+TTP) eller uten (OA*) 100 μM TTP i det siste døgnet av differensieringsperioden. A) Opptak ($\text{CO}_2 + \text{ASM} + \text{CA}$) for atlet- og utrentgruppen. B) Opptak ($\text{CO}_2 + \text{ASM} + \text{CA}$) for begge gruppene samlet. C) Opptak (CO_2) for atlet- og utrentgruppen. D) Oksidasjon (CO_2) for begge gruppene samlet. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM, A og C: fra seks uavhengige forsøk i hver gruppe (n=6); B og D: fra 12 uavhengige forsøk i hver gruppe (n=12). [#]p<0,05 vs. OA*.

Slik som for glukosemetabolismen, ble det gjort to uavhengige forsøk der 100 μM TTP var tilstede under trappingen i fire timer. Myotuber viste reduksjon av både oljesyreopptak (figur 3.19 A) og -oksidasjon (figur 3.19 B) som følge av tilstedeværelse av TTP under inkuberingen.



Figur 3.19: Effekter på fettsyremetabolismen ved ulike tidslengder av TTP-behandling.

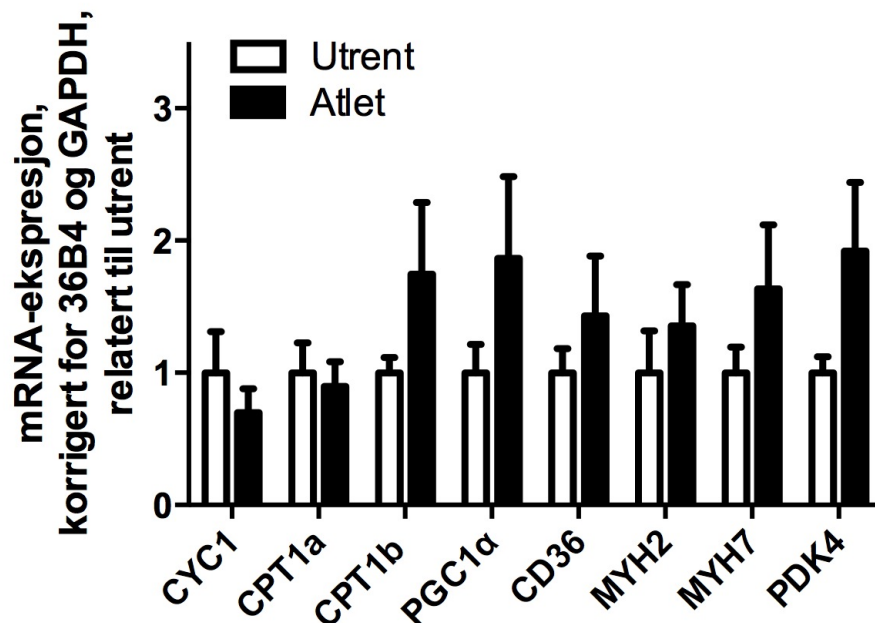
Opptak ($\text{CO}_2 + \text{ASM} + \text{CA}$) og oksidasjon (CO_2) av $100 \mu\text{M}$ [^{14}C]oljesyre ble bestemt etter fire timer for myotuber behandlet uten (OA^*) eller med $100 \mu\text{M}$ TTP tilstede ($\text{OA}^* + \text{TTP}$ akutt) i det siste døgnet av differensieringsperioden ($\text{OA}^* + \text{TTP}$ 24 t). Da forsøkene ble utført på to ulike tidspunkt ble dataene relatert til basal. A) Opptak ($\text{CO}_2 + \text{ASM} + \text{CA}$). B) Oksidasjon (CO_2). Resultatene er normalisert for basal, og presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra 12 uavhengige forsøk for $\text{OA}^* + \text{TTP}$ 24 timer ($n=12$) og to uavhengige forsøk for $\text{OA}^* + \text{TTP}$ akutt ($n=2$). Statistikk ble ikke beregnet da $n=2$ for $\text{OA}^* + \text{TTP}$ akutt.

3.8 mRNA-ekspressjon av gener

Trening er vist å påvirke transkripsjon av gener involvert i glukose- og lipidmetabolismen. Herunder har muskelkontraksjon vist påvirkning av gener involvert i metabolsk fleksibilitet av skjelettmuskelen [38]. På bakgrunn av dette var det ønskelig undersøke om mRNA-ekspressjon for myotuber fra atletgruppen, både med og uten behandling med GW501516, var forskjellig sammenlignet med mRNA-ekspressjon for myotuber fra utrentgruppen. På bakgrunn av atletparadokset, beskrevet i avsnitt 1.5, og data fra de funksjonelle studiene på myotubene var det av interesse å undersøke mRNA-ekspressjon spesielt med hensyn på lipidmetabolismen.

De siste fire døgnene av differensieringsperioden ble myotuber behandlet med 10 nM GW501516 eller $0,1 \%$ DMSO (kontroll). Genekspressjon av CYC1, CPT1a, CPT1b, PGC1 α , CD36, MYH2, MYH7 og PDK4 (se tabell 2.3 og 2.4) ble kvantifisert ved qPCR. De kvantifiserte genene ble normalisert for 36B4, GAPDH og gjennomsnittet av 36B4 og GAPDH. Videre ble alle resultatene fra basaltilstanden relatert til mRNA-ekspressjon for utrentgruppen. mRNA-ekspressjon av de kvantifiserte genene viste det samme bildet for alle de tre korrigeringene (data ikke presentert). Ved korrigering for 36B4 var det imidlertid tendens til høyere mRNA-ekspressjon av PDK4 ($p=0,10$) for myotuber fra atletgruppen sammenlignet med celler i utrentgruppen. Figur 3.20 viser at det ikke ble funnet noen signifikante forskjeller for myotuber fra atlet- og utrentgruppen med hensyn på mRNA-

ekspresjon korrigert for gjennomsnittet av 36B4 og GAPDH. Resultatene oppsummert i tabell i appendiks 8.1

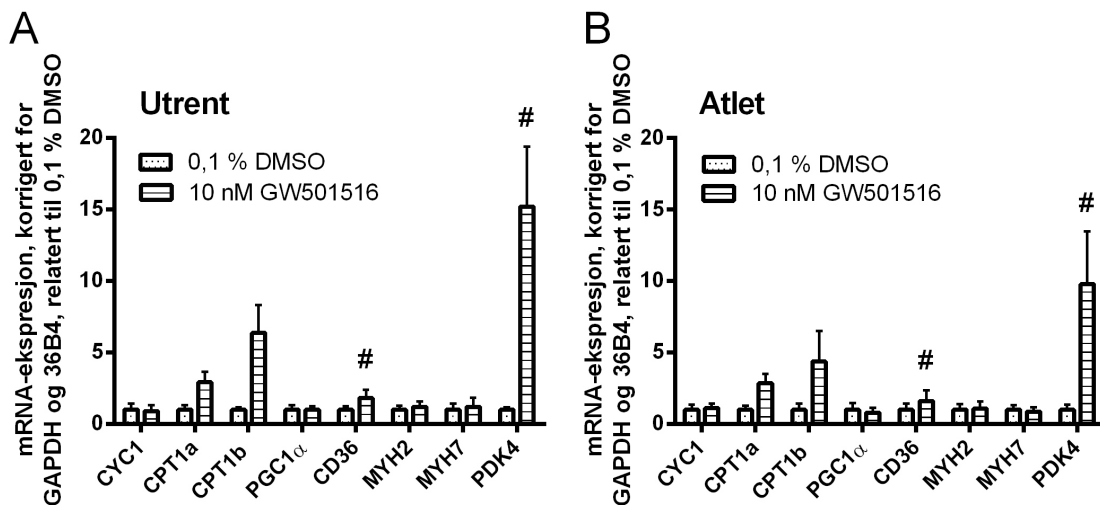


Figur 3.20: mRNA-ekspresjon for myotuber. Myotuber ble dyrket for kvantitativ polymerasekjedereaksjon (qPCR), og mRNA-ekspresjon av CYC1, CPT1a, CPT1b, PGC1α, CD36, MYH2, MYH7 og PDK4 ble deretter kvantifisert ved qPCR og korrigert for gjennomsnittet av 36B4 og GAPDH. Resultatene er relatert til mRNA-ekspresjon for utrent, og vises som gjennomsnitt ± SEM fra seks uavhengige forsøk i hver gruppe (n=6). $n_{CPT1a}=5$ for utrentgruppen, $n_{CPT1b}=5$ for begge gruppene. 36B4, syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0; CD36, "cluster of differentiation" 36; CYC1, cytokrom c-1; GAPDH, glyseraldehyd 3-fosfatdehydrogenase; CPT, karnitin palmitoyltransferase; MYH7, myosin tungkjedegen-β; MYH2, myosin tungkjedegen-2A; PDK, pyruvat dehydrogenase; PGC1α, PPARγ koaktivator-1α.

PPARδ er viktig i regulering av flere gener i skjelettmuskel, og Feng et al. fant blant annet økt genekspresjon av PDK4, CD36, CPT1a som følge av GW-behandling av humane myotuber [29]. For myotubene samlet fra begge gruppene resulterte behandling med GW501516 i de siste fire døgnene av differensieringsperioden resulterte til signifikant høyere mRNA-ekspresjon av CPT1a, CPT1b, CD36 og PDK4 korrigert for 36B4 og GAPDH sammenlignet med kontroll (data ikke presentert). Effekter av GW501516 på mRNA-ekspresjon i myotuber er oppsummert i tabell i appendiks 8.2.

Det var ingen signifikante forskjeller mellom mRNA-ekspresjon av de ulike genene i atlet- eller utrentgruppen som følge av GW-behandling. Som vist i figur 3.21 A og B ble det imidlertid observert tendens til høyere mRNA-ekspresjon av CPT1b for myotuber fra atletgruppen etter GW-behandling sammenlignet med DMSO ($p=0,06$), mens dette ikke var tilfellet for myotuber fra utrentgruppen. mRNA-ekspresjon av CPT1a tenderte til å være høyere etter GW-behandling i både atlet- og utrentgruppen ($p=0,06$), mens mRNA-ekspresjon

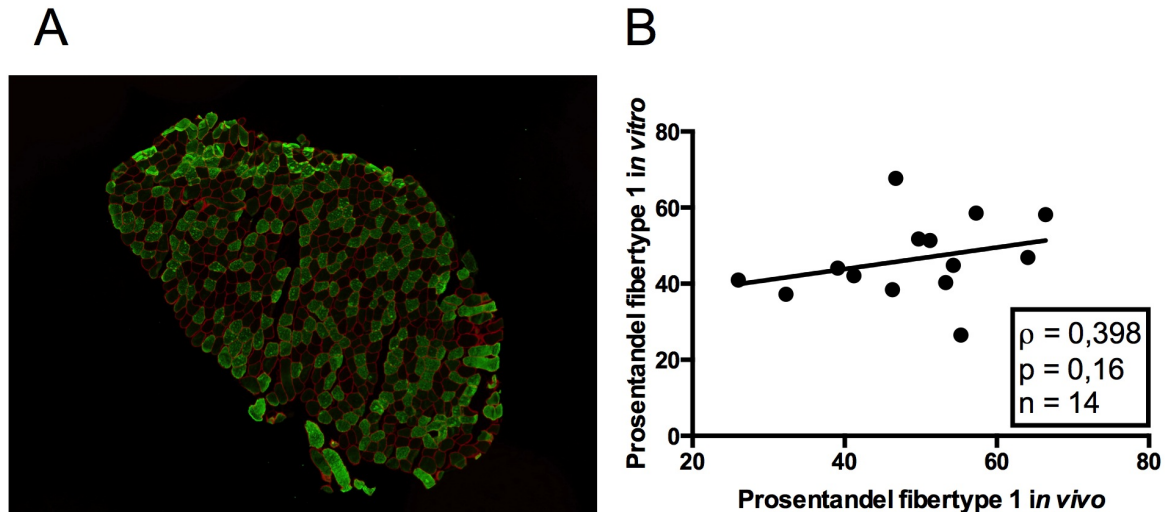
av CD36 og PDK4 var signifikant høyere i myotuber fra begge gruppene etter GW-behandling.



Figur 3.21: mRNA-ekspresjon for myotuber etter behandling med GW501516. Myotuber ble dyrket til kvantitativ polymerasekjedereaksjon (qPCR), og behandlet med 10 nM GW501516 og 0,1 % DMSO i de siste fire døgnene av differensieringsperioden. Genuttrykk ble kvantifisert ved qPCR. # $p < 0,05$ vs. 0,1 % DMSO. A) mRNA-ekspresjon i utrentgruppen. B) mRNA-ekspresjon i atletgruppen. Resultatene vises som gjennomsnitt \pm SEM fra seks uavhengige forsøk for hver behandling ($n=6$). $n_{CPT1a}=5$, for begge gruppene, $n_{CPT1b}=5$ for utrentgruppen. 36B4, syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0; CD36, "cluster of differentiation" 36; CYC1, cytokrom c-1; GAPDH, glyseraldehyd 3-fosfatdehydrogenase; CPT, karnitin palmitoyltransferase; MYH7, myosin tungkjedegen- β ; MYH2, myosin tungkjedegen-2A; PDK, pyruvat dehydrogenase kinase; PGC1 α , PPAR γ koaktivator-1 α .

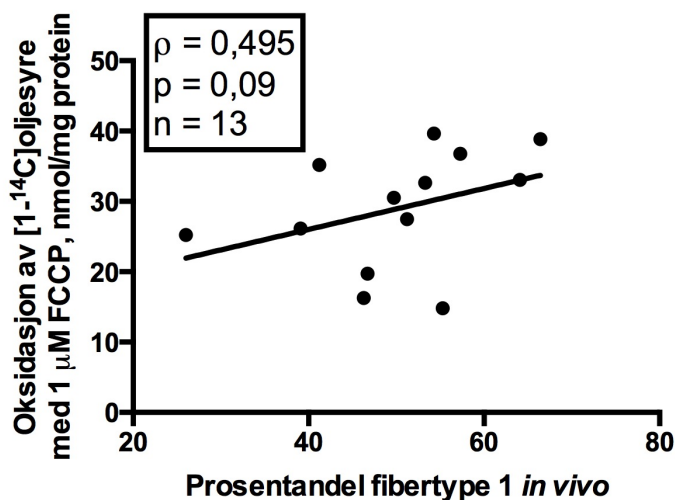
3.9 Fibertypefordeling og korrelasjoner

Type 1-muskelfibre er beskrevet å ha større lagringskapasitet for lipider enn type 2-fibre. I tillegg er det rapportert å være mer oksidative sammenlignet med type 2-fibre [6, 9]. Det var derfor ønskelig å undersøke om fibertypefordelingen *in vivo* gjenspeilet disse egenskapene *in vitro*. I tillegg var det ønskelig å finne ut om det var en sammenheng mellom markører for prosentandel fibertype 1 *in vivo* og *in vitro* da dette ikke tidligere er undersøkt. I tillegg var det ønskelig å undersøke for treningseffekter på fibertypefordeling i skjelettmuskel ettersom det er rapportert motsigende resultater i litteraturen [13, 14, 35]. Fibertypefordeling fra et tverrsnitt av skjelettmuskelen (figur 3.22 A) ble sammenlignet med fibertypefordelingen målt som mRNA-ekspresjon i myotuber isolert fra den samme biopsien. Det var ingen sammenheng mellom markører for prosentandel fibertype 1 *in vivo* og *in vitro* (figur 3.22 B).



Figur 3.22: Fibertypefordeling. A) Tverrsnitt av skjelettmuskelbiopsiene ble analysert ved Norges idrettshøgskole. Type 2-fibre er farget grønne, mens type 1-fibre er umerkede. Rødt er farging av dystrofin i cellemembranen. B) Sammenheng mellom prosentandel fibertype 1 i henholdsvis biopsien og i myotuber. mRNA-ekspressjon av MYH7 og MYH2 ble kvantifisert ved kvantitativ polymerasekjedereaksjon (qPCR). Prosentandel fibertype 1 *in vitro* ble beregnet som $[(MYH7/MYH2+MYH7) \times 100 \ %]$, og sammenlignet med prosentandel fibertype 1 *in vivo* beregnet på samme måte. $\rho=0,398$, $p=0,16$. Resultatene vises som gjennomsnitt \pm SEM fra 14 uavhengige forsøk ($n=14$). MYH7, myosin tungkjedegen- β ; MYH2, myosin tungkjedegen-2A.

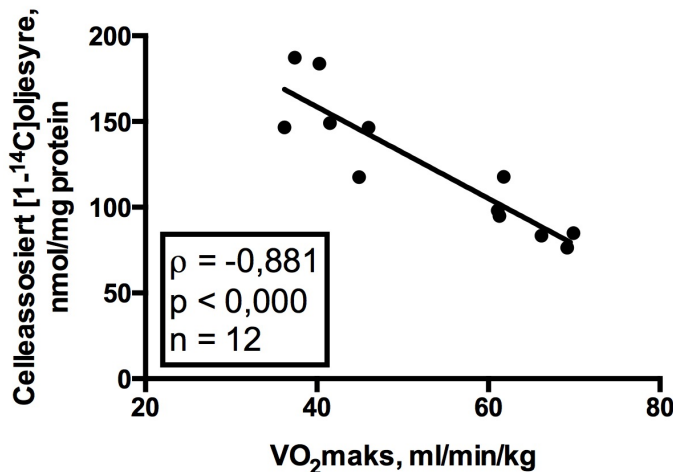
Det var ingen signifikante korrelasjoner mellom prosentandel fibertype 1 i biopsien og henholdsvis opptak og oksidasjon av $100 \ \mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]$ oljesyre i myotubene (data ikke presentert). På tross av at dette ble det observert en tendens til korrelasjon mellom prosentandel fibertype 1 i biopsien og oljesyreoksidasjon etter FCCP-behandling av myotubene (figur 3.23).



Figur 3.23: Tendens til korrelasjon mellom prosentandel fibertype 1 *in vivo* og oljesyreoksidasjon av etter frikobling. Prosentandel fibertype 1 ble bestemt ved bruk av immunohistokjemi ved Norges idrettshøgskole. Myotuber ble behandlet akutt med $1 \ \mu\text{M}$ FCCP under oksidasjon av $100 \ \mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]$ oljesyre som ble bestemt ved bruk av substratoksidasjonsmetoden. Resultatene vises som gjennomsnitt \pm SEM fra 13 uavhengige forsøk ($n=13$). (Dette er fordi det ikke var tilstrekkelig tid til å gjøre dette forsøket for alle de 14 donorene).

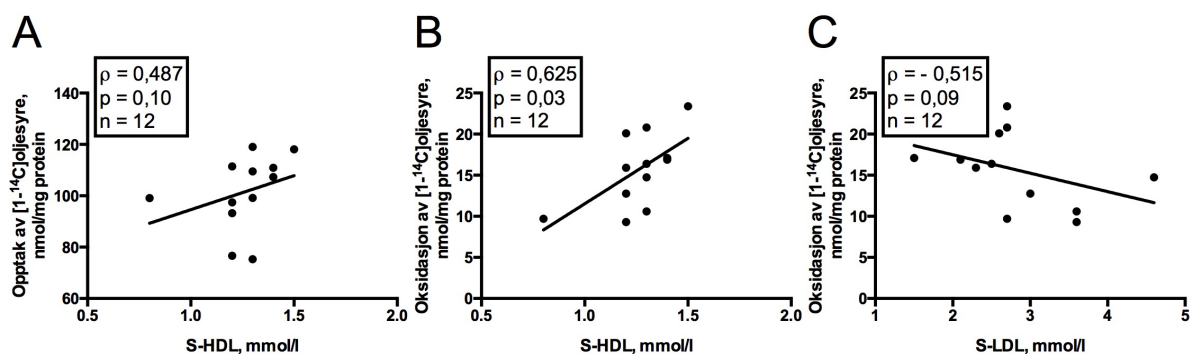
3.10 Korrelasjoner mellom *in vivo*- og *in vitro*-data

Det ble undersøkt for sammenhenger (korrelasjoner) mellom *in vivo*- og *in vitro*-data fra begge grupper samlet. På bakgrunn av at det ikke ble funnet forskjeller mellom gruppene i respons med hensyn på tid (4 timer vs. 28 timer) ble alle isotopdataene slått sammen. Figur 3.24 viser at det ble observert signifikant negativ korrelasjon mellom akkumulering av [^{14}C]oljesyre (CA) i myotuber og forsøkspersonenes VO_2maks .



Figur 3.24: Korrelasjon mellom VO_2maks og fettsyreakkumulering (CA) i myotuber. Forsøkspersonenes VO_2maks ble målt ved Norges idrettshøgskole. Oljesyreakkumulering (CA) ble bestemt ved tilstedeværelse av [^{14}C]oljesyre i fire timer eller etter forbehandling i 24 timer med [^{14}C]oljesyre før inkubering i fire timer uten fettsyre tilstede. Resultatene fra forsøkene der CA ble målt i henholdsvis fire og 28 timer ble slått sammen. Celleassosiert (CA) $100\ \mu\text{M}$ [^{14}C]oljesyre ble bestemt ved bruk av substratoksidasjonsmetoden.

Det ble funnet sammenhenger mellom oljesyremetabolisme i myotuber og henholdsvis serum-HDL og serum-LDL. Dette er illustrert i figur 3.30 A-C. Det var tendens til positiv korrelasjon mellom serum-HDL og oljesyreopptaket i myotuber (figur 3.25 A). Videre var det en signifikant positiv korrelasjon mellom serum-HDL og oksidasjon av oljesyre for myotuber (figur 3.25 B). I tillegg ble det observert tendens til at høyere nivå av serum-LDL sto i sammenheng med lavere oljesyreoksidasjon for myotuber (figur 3.25 C).



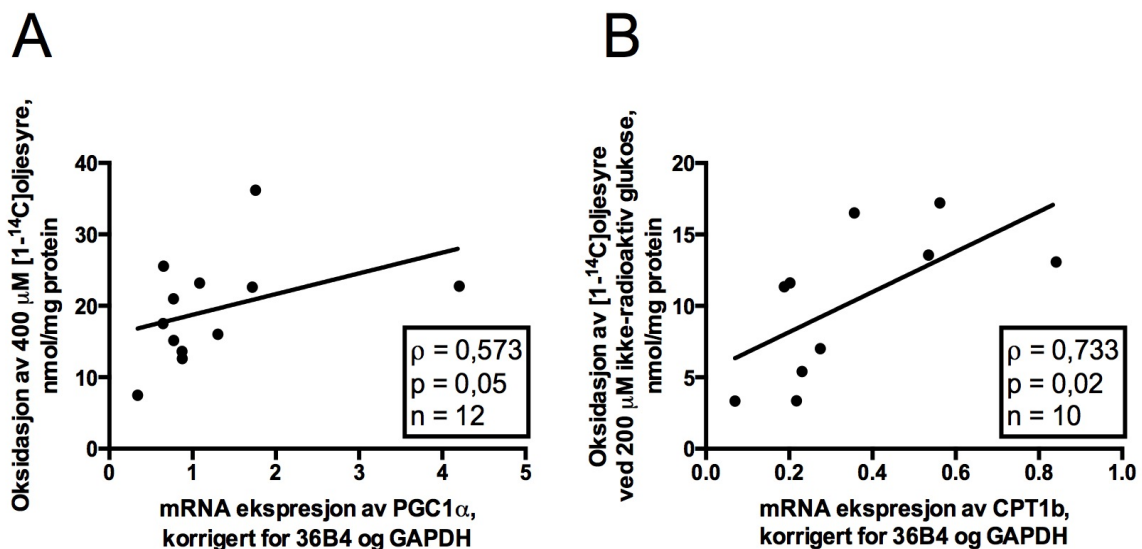
Figur 3.25: Korrelasjoner mellom lipidprofil *in vivo* og oljesyremetabolisme *in vitro*. Opptak ($\text{CO}_2 + \text{ASM} + \text{CA}$) og oksidasjon (CO_2) av $100\ \mu\text{M}$ [^{14}C]oljesyre ble beregnet fra gjennomsnittet av to uavhengige forsøk fra hver donor ved bruk av substratoksidasjonsmetoden. Blodprøver av serum-HDL (mM) og serum-LDL

(mM) ble tatt ved Norges idrettshøgskole og analysert ved Fürst Medisinsk Laboratorium. A) Tendens til positiv korrelasjon mellom serum-HDL (nM) og oljesyreopptak. B) Positiv korrelasjon mellom serum-HDL (mM) og oljesyreoksidasjon. C) Tendens til negativ korrelasjon mellom serum-LDL (mM) og oljesyreoksidasjon. Resultatet er presentert som gjennomsnitt fra 12 uavhengige forsøk i hver gruppe (n=12). HDL, "high-density" lipoprotein; LDL, "low-density" lipoprotein.

3.11 *In vitro* - *in vitro*-korrelasjoner

Genekspresjonsdata benyttet i korrelasjonsanalysene ble bestemt fra 12 uavhengige donorer, og korrigert for et gjennomsnitt av de endogene kontrollene 36B4 og GAPDH. For mRNA-ekspressjon av CPT1a og CPT1b er antall donorer totalt henholdsvis $n_{CPT1a}=11$, $n_{CPT1b}=10$. Dette er grunn av manglende respons ved de utførte forsøkene, samt tidsmessige grunner i forhold til repetering av forsøk.

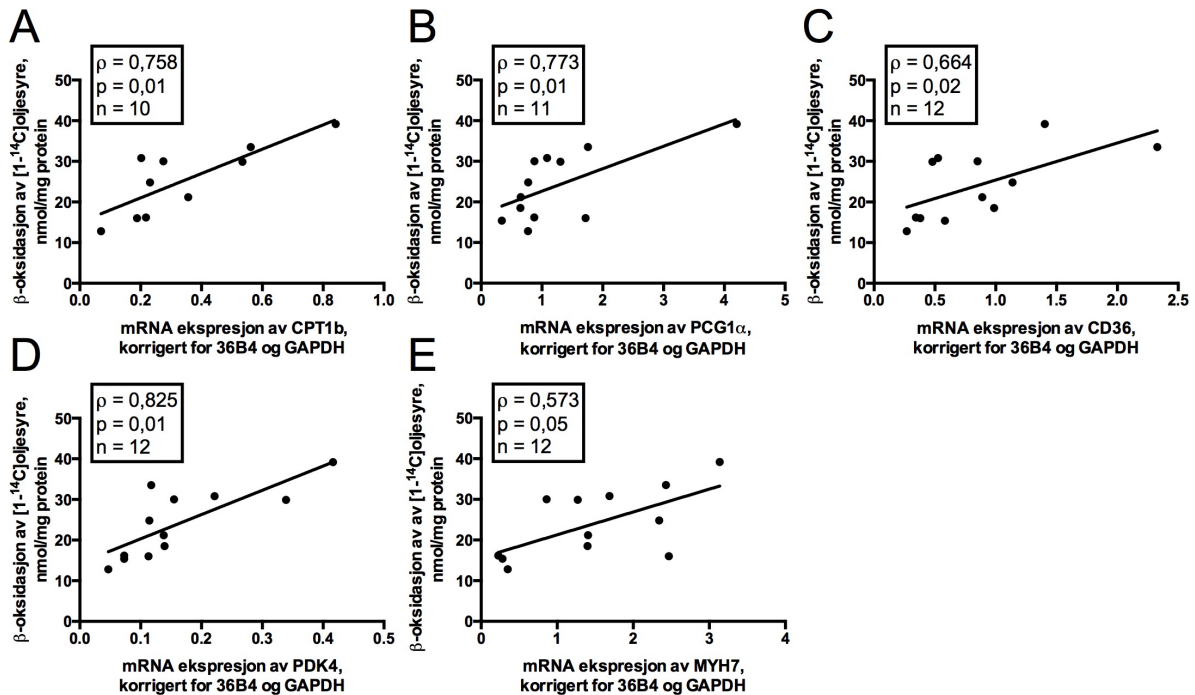
Figur 3.26 A illustrerer at det var tendens til positiv korrelasjon mellom oksidasjon av 400 μM [^{14}C]oljesyre i fire timer og mRNA-ekspressjon av PGC1 α . I tillegg ble det observert signifikant positiv korrelasjon mellom oksidasjon av 100 μM [^{14}C]oljesyre i fire timer etter tilstedeværelse (akuttbehandling) av 200 μM ikke-radioaktiv glukose og mRNA-ekspressjon av CPT1b (figur 3.26 B).



Figur 3.26: Korrelasjoner mellom mRNA-ekspressjon og oljesyremetabolisme i myotuber. Oljesyreoksidasjon ble bestemt ved bruk av substratoksidasjonsmetoden og [^{14}C]oljesyre. mRNA-ekspressjon av PGC1 α og CPT1b ble bestemt ved kvantitativ polymerasekjedereaksjon (qPCR). A) Positiv korrelasjon mellom oksidasjon (CO_2) av 400 μM [^{14}C]oljesyre i fire timer og PGC1 α . B) Positiv korrelasjon mellom oksidasjon av 100 μM [^{14}C]oljesyre etter akuttbehandling med 200 μM ikke-radioaktiv glukose og CPT1b. Resultatet er presentert som gjennomsnitt fra 12 uavhengige forsøk i hver gruppe (n=12). $n_{CPT1b}=10$. 36B4, syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0; GAPDH, glyseraldehyd 3-fosfatdehydrogenase; CPT, karnitin palmitoyltransferase; PGC1 α , PPAR γ koaktivator-1 α .

Resultater

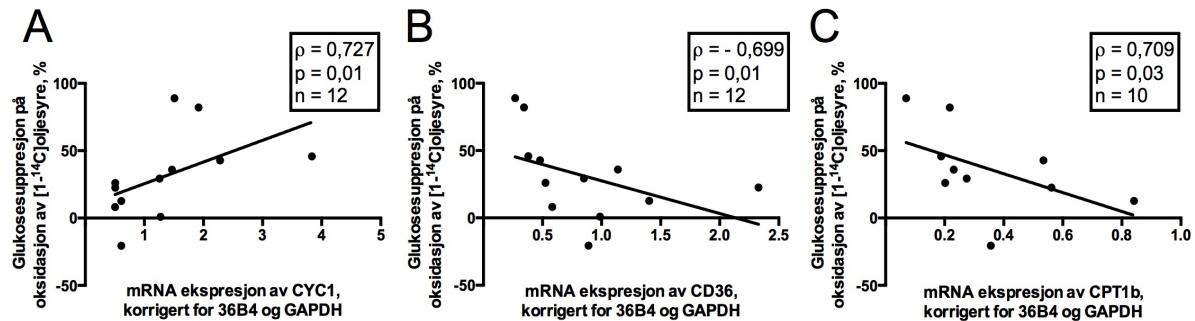
Figur 3.27 A-E viser at det var signifikante positive korrelasjoner mellom β -oksidasjon av 100 μM [^{14}C]oljesyre i myotuber og mRNA-ekspresjon for henholdsvis CPT1b, PGC1 α , CD36, PDK4 og MYH7.



Figur 3.27: mRNA-ekspresjon og β -oksidasjon av oljesyre i myotuber. Ved analyse av syreløselige metabolitter (ASM) ble β -oksidasjon av 100 μM [^{14}C]oljesyre ble bestemt. mRNA-ekspresjon av CPT1b, PGC1 α , CD36, PDK4 og MYH7 ble bestemt ved kvantitativ polymerasekjedereaksjon (qPCR). Signifikant positiv korrelasjon mellom β -oksidasjon (ASM) av [^{14}C]oljesyre i myotuber og A) CPT1b. B) PGC1 α . C) CD36. D) PDK4. E) MYH7. Resultatene er presentert som gjennomsnitt fra 12 uavhengige forsøk i hver gruppe ($n=12$). $n_{\text{CPT1b}}=10$. 36B4, syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0; CD36, "cluster of differentiation" 36; GAPDH, glyseraldehyd 3-fosfatdehydrogenase; CPT, karnitin palmitoyltransferase; MYH7, myosin tungkjedegen- β ; PDK, pyruvat dehydrogenase kinase; PGC1 α , PPAR γ koaktivator-1 α .

Resultater

Figur 3.28 A illustrerer positiv korrelasjon mellom mRNA-ekspresjon av CYC1 og glukosesuppresjon (%) i myotuber, mens mRNA-ekspresjon av henholdsvis CD36 (figur 3.28 B) og CPT1b (figur 3.28) korrelerte negativt med glukosesuppresjon (%) i myotuber.



Figur 3.28: mRNA-ekspresjon og glukosesuppresjon i myotuber. Differensierte skjelettmuskelceller ble akutt behandlet med 200 μM ikke-radioaktiv glukose før oksidasjon av 100 μM $[^{14}\text{C}]$ oljesyre ble bestemt ved bruk av substratoksidasjonsmetoden. Videre ble suppresjon av glukose på oksidasjon av $[^{14}\text{C}]$ oljesyre bestemt ved bruk av formel 2 (se avsnitt 3.6). mRNA-ekspresjon av CYC1, CPT1b og CD36 ble bestemt ved kvantitativ polymerasekjedereaksjon (qPCR). A) Positiv korrelasjon mellom CYC1 og glukosesuppresjon (%). B) Negativ korrelasjon mellom CD36 og glukosesuppresjon (%). C) Negativ korrelasjon mellom CPT1b og glukosesuppresjon (%). Resultatet er presentert som gjennomsnitt fra 12 uavhengige forsøk ($n=12$). $n_{\text{CPT1b}}=10$. 36B4, syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0; CD36, "cluster of differentiation" 36; CYC1, cytokrom c-1; GAPDH, glyseraldehyd 3-fosfatdehydrogenase; CPT, karnitin palmitoyltransferase.

4 Diskusjon

4.1 Vurdering av atlet-studien

Maksimalt oksygenopptak (VO_2 maks) er et mål på aerob kapasitet, og gjenspeiler den øver grensen av oksygen som kan brukes til å produsere ATP ved en aerob tilstand per minutt per kilo kroppsvekt. Gruppeinndelingen i denne studien ble basert på denne parameteren. Denne fordelingen gjenspeilet gruppeinndelingen ved rekruttering av forsøkspersoner på best måte, da det bare var en forsøksperson etter rekruttering som ble plassert i den andre gruppen i henhold til VO_2 maks-fordelingen. I litteraturen er denne parameteren ofte benyttet til å beskrive effekt av trening og det foreligger en tidligere studie som undersøkte forskjeller mellom godt trente og utrente individer etter VO_2 maks-inndeling [25]. Dette var en fordel i forhold til mulighet for sammenligning med tidligere studier. I tillegg er parameteren påvirket av trening og treningsintensitet [97], og VO_2 maks ble derfor antatt som en god parameter til å bestemme inndelingen mellom en utrent og en godt trent gruppe (atleter). Studier har vist at en intervensjon med utholdenhetstrening resulterer i økt VO_2 maks [13, 14]. Det er kjent at genetikk kan påvirke utholdenhetskapasitet hos et individ, men på den annen side er det funnet så mange ulike genotyper av betydning at forskjeller mellom individer utjevnes. Williams og Folland fant at det var svært lite sannsynlig at et individ hadde en ”perfekt” polygenetisk profil i forhold til utholdenhetskapasitet, og sannsynligheten for dette ble kalkulert til 0,0005 % [98]. Dette betyr at VO_2 maks i stor grad vil gjenspeile individenes utholdenhet som følge av trening. På den annen side kan det være vanskelig å få en stabil VO_2 maks-verdi dersom forsøkspersonen ikke orker å løpe/sykle så lenge på intensiteten som tilsvarer VO_2 maks. I tillegg ga fordeling av forsøkspersonene etter fysisk kapasitet per kroppsvekt (watt/kg) lik fordeling som VO_2 maks-inndelingen, og resultatene viste positiv korrelasjon mellom de to *in vivo*-parameterne hvilket ytterligere styrker gruppeinndelingen. Gruppene ble videre forsøkt inndelt avhengig av fibertypefordeling slik at gruppen med høyest andel fibertype 1 ble karakterisert som atleter, mens utvalget med høyest fibertype 2 ble betegnet som kontrollgruppe. Det ble ikke riktig å kalle den ene gruppen utrent da to av forsøkspersonene i kontrollgruppen hadde VO_2 maks ≥ 60 ml/kg/min ved fordeling etter fibertype. Denne fordelingen vil i stor grad være preget av genetiske faktorer, og det foreligger usikkerhet om effekt av trening på fibertypefordelingen [13, 14]. Ved inndeling etter fibertypefordeling av skjelettmuskelen *in vivo* ble flere godt trente, i henhold til VO_2 maks og treningsmengden de oppga, karakterisert som utrente.

Respiratorisk utvekslingsforhold (RER) benyttes for å si noe om energimetabolismen, og ble vurdert som parameter til gruppeinndelingen i studien. RER-verdien er rapportert å være lavere (høyere metabolisme av lipider) hos godt trente sammenlignet med utrente individer, i tillegg til å være relatert til metabolsk fleksibilitet av skjelettmuskel [51, 99]. RER-måling ved 60 % ble benyttet da forsøkspersonen på dette tidspunktet allerede var blitt målt noen ganger. Dette var for å styrke validiteten av målingene ettersom individene da var blitt mer vant til masken som ble benyttet under målingene. I tillegg ble disse RER-verdiene regnet som mer pålitelige da de ikke var lik 1. Inndeling av grupper i forhold til RER-verdi, der en gruppe i størst grad benyttet karbohydrater, mens den andre gruppen i størst grad benyttet lipider som energikilde, utgjorde ingen tydelig gruppeinndeling i forhold til oppgitt treningsmengde, og verdiene var i tillegg ganske like for alle forsøkspersonene.

Borgs skala var en fjerde parameter som ble vurdert til å inndelegge individene i to grupper, og utviser forsøkspersonenes opplevde anstrengelse. Parameteren er subjektiv og påvirkes av ulik smerteterskel og evne til å fysisk presse seg, hvilket vil være en svakhet. To av forsøkspersonene som opprinnelig var rekruttert til utrentgruppen ble betegnet som atleter i forhold til denne skalaen. Inndeling i forhold til Borgs skala ble dermed vurdert til å gi en dårlig inndeling av utrente og godt trente individer.

Forarbeidet til studien var allerede ferdig før oppstart med denne masteroppgaven. Atletstudien var en parallellfordelt, ikke-randomisert studie for å sammenligne energimetabolisme i myotuber fra godt trente (atleter) og utrente individer. Både deltakerenes og studiens sikkerhet og validitet ble sikret ut fra valgte inklusjons- og eksklusjonskriteriene (se appendiks 6.1 og 6.2). På bakgrunn av dette ble også studiens formål oppnådd på en god måte. VO_2 maks ble bestemt ved Norges idrettshøgskole etter en standardisert prosedyre på sykkel. Før selve testen gjennomførte deltakerne en standardisert oppvarmingsperiode samt en test på 30 minutter for å bli kjent med test-forholdene. Atletene er individer som jevnlig har trent hele livet, mens de utrente aldri har drevet med systematisk trening. Dette gjorde det mulig å se på livslang regulering av trening på skjelettmuskel i myotuber, i motsetning til bare å se på effekter etter en kortvarig treningsintervensjon. En ulempe med studien er imidlertid at treningsforskjellen mellom gruppene kan forstyrres av genetiske variasjoner mellom de to uavhengige gruppene. I tillegg var det spesielt to individer i utrentgruppen med høyere KMI-verdi enn de andre, og dette kan potensielt være forstyrrende for resultatene.

4.2 Vurdering av metodene i studien

Mononukleære satelittceller i skjelettmuskel, identifisert av Mauro [100] og Katz [101] i 1961, er assosiert til muskelfibre *in vivo*. Celletypen kan isoleres fra skjelettmuskelbiopsier [102], for så å dyrkes opp til myoblaster, og videre differensieres til myotuber [103, 104]. Satelittceller er vanligvis ikke aktive, men aktiveres i postnatal muskelvekst, etter skade eller ved intensiv fysisk aktivitet, og bidrar til dannelse av nye muskelfibre alene eller sammen med allerede eksisterende muskelfibre [102]. På bakgrunn av at myotuber dyrket og differensiert på denne måten er vist å ha lignende metabolisme [105, 106] og morfologi [84] som skjelettmuskel *in vivo*, er dette systemet ansett som en god *in vitro*-modell for human skjelettmuskel. *In vivo* vil blant annet blodgjennomstrømning, hypoksi [107], endokrin påvirkning, og kommunikasjon med andre celletyper [60], som for eksempel nerveceller [11], ha innvirkning på skjelettmuskel, mens *in vitro* er disse fysiologiske faktorene eliminert. Dette gir mulighet til å overvåke det ekstracellulære miljøet meget nøye, men kan også være en ulempe da disse faktorene ikke blir tatt hensyn til. I tillegg er det fordelaktig med en cellemodell av denne art fordi disse cellene er av større relevant genetisk bakgrunn for å studere effekt av trening på humane sykdommer fremfor cellemodeller fra dyr. Det er blant annet vist at glukoseopptak er redusert i myotuber fra pasienter med T2D [106]. I tillegg kan det tenkes at epigenetiske endringer kan medieres i stamceller som følge av trening. I en studie av Barrés et al. er det vist at akutt trening påvirker DNA-metylering av flere gener i biopsi fra *musculus vastus lateralis* [37]. Videre er det kjent at både satelittceller [108] og skjelettmuskel [109] er under epigenetisk kontroll. Type 2-fibre er uttrykt i større grad enn type 1-fibre i myotuber [84], og dette resulterer i at metabolismen *in vivo* er mer oksidativ enn metabolismen *in vitro* som er mer glykolyttisk. I tillegg er glukoseopptak lavere i myotuber sammenlignet med i skjelettmuskel, ettersom det hovedsakelig er GLUT4 som medierer glukoseopptak *in vivo* på stimuli fra insulin og muskelkontraksjon, mens det hovedsakelig er GLUT1 som er uttrykt *in vitro* [21, 110]. Oksygen er en kritisk parameter for alle levende celler, og ved en normaltilstand er intracellulær pO_2 i skjelettmuskel rapportert å være omtrent 4 % [107], til sammenligning dyrkes muskelcellene ved cirka 20 % pO_2 . Dette kan være av betydning for differensiering og for metabolske egenskaper til myotuber [111]. I tillegg er det rapportert at mRNA-ekspresjon av flere gener er høyere *in vivo* enn *in vitro* [5]. Oksidativ kapasitet av myotuber *in vitro* er imidlertid lavere enn for tilstanden *in vivo* [5].

Substratoksidasjonsmetoden, benyttet til å måle energimetabolisme av [^{14}C]oljesyre og [^{14}C]glukose for myotuber fra atlet- og utrentgruppen, er en veletablert metode beskrevet av

Wensaas et al. [85]. Glukoseisotopen har radioaktive C-atomer i alle de seks karbonene i glukoseskjelettet. Dette betyr at noe CO₂ også potensielt kan frigjøres tidligere i nedbrytningen av glukosemolekylet, og da oppfattes som oksidasjonsprodukt. Dette kan gi en overestimering av glukoseoksidasjonen. I tidligere forsøk der man har blokkert mitokondriell oksidasjon har man sett at denne frigjøringen ikke er av vesentlig betydning, og dette ble ikke tatt hensyn til i beregningene til disse forsøkene. På den annen side kan det ikke utelukkes at CO₂-frigjøringen kan være ulik for myotuber fra atlet- og utrentgruppen. Metoden til bruk for bestemmelse av β -oksidasjon ved å analysere syreløselige metabolitter (ASM) innebærer en viss usikkerhet på grunn av stor grad av fortynning. På bakgrunn av dette ble de målte verdiene sammenlignet, i tillegg til at opptak beregnet av CO₂+ASM+CA ble sammenlignet med CO₂+CA. Bradfords metode for bestemmelse av celleprotein er også en veletablert metode, og gir en hurtig bestemmelse av proteinverdien [86]. RNA ble isolert etter en standardisert prosedyre av QIAGEN® (Austin, Texas) før qPCR ble benyttet til bestemmelse av genuttrykk *in vitro*. Metoden er godt etablert og ble først beskrevet av Mullis et al. som ble berømmet med Nobels pris i kjemi i 1993 [112].

Fibertypebestemmelse av skjelettmuskel fra biopsimateriale utvunnet ved hjelp av nålbiopsiteknikk har en viss usikkerhet, i tillegg til at det kan være store variasjoner i fibertypefordeling for en spesifikk biopsi og mellom ulike typer skjelettmuskel [7]. Blomstrand og Ekblom rapporterte feilmargen med hensyn på prosentandel type 1-fibre på 6,2 % ved flere biopsier fra *musculus vastus lateralis* fra et ben, samt et avvik på 12,3 % ved biopsianalyser av *musculus vastus lateralis* fra begge ben [113]. Det er imidlertid ikke kjent at det foreligger studier på samsvar mellom fibertypesammensetning i biopsi og cellekultur.

Til beregning av statistikk ble Wilcoxon-test for parett sammenheng og Mann-Whitney-test for uparet sammenheng mellom utvalgene benyttet. Dette er ikke-parametriske tester, og disse ble benyttet da det ikke var mulig å anta normalfordeling i datasettet samt at det var et lite antall observasjoner. Utvalgene som ble sammenlignet hadde i tillegg en lignende sannsynlighetsfordeling, hvilket er nødvendig for å kunne benytte testene ettersom de nevnte testene sammenligner medianene til gruppene [114]. På bakgrunn av at det ikke ble observert store avvik mellom gjennomsnitt og median i datasettene var gjennomsnittet anvendbart til å beskrive datasettet. Fordelen med denne ikke-parametriske testen er at den er robust ettersom den er mindre følsom for ekstreme observasjoner som kan skyldes måle- eller inntastingsfeil. Testen tar hensyn til tallrekkefølgen, og ikke tallenes størrelse i seg selv, og dette kan føre til at informasjonen i datamaterialet utnyttes på en dårligere måte.

For å se på samlede effekter ble det imidlertid benyttet statistisk blandet modell-analyse ("Mixed modell analysis") i SPSS 20.0. Denne analysen gjør det mulig å undersøke flere parametre (variabler) samtidig ved at hele datasettet sees på under ett for å få den samlede effekten. På denne måten oppnås et større antall frihetsgrader. I tillegg utnyttes datasettet mer effektivt, men en forutsetning er at det ikke er en forskjell mellom gruppene innad for en gitt respons. Spearmans test ble benyttet for korrelasjonsanalysene. Dette er en ikke-parametrisk test som undersøker statistisk sammenheng mellom to variabler. Korrelasjonskoeffisienten, ρ , angir styrken mellom to variable ved bruk av en monoton funksjon. Fortegnet til koeffisienten, rho (ρ), angir om sammenhengen er positiv eller negativ.

4.3 Glukosemetabolisme

I denne studien viste glukoseopptak- og oksidasjon ingen forskjeller for myotuber fra utholdenhetstrening og utrente personer. Disse resultatene indikerer at treningstilstand *in vivo* ikke påvirker glukosemetabolismen i skjelettmuskelceller. I litteraturen er utholdenhetstrening imidlertid rapportert å mediere høyere uttrykk av GLUT4 *in vivo* [33-35], i tillegg høyere glukoseopptak hos godt trente individer sammenlignet med utrente personer [92]. Det kan tenkes at et økt uttrykk av GLUT4 medierer høyere glukoseopptak og økt glukoseoksidasjon som resultat av dette. På bakgrunn av at glukoseopptaket er bestemt i myotuber i denne studien, og ikke *in vivo* som de overnevnte studiene, kan dette være en faktor slik at det ikke sees forskjeller mellom gruppene. Muskelkontraksjon stimulerer i størst grad GLUT4-medierte glukoseopptak [21], og på bakgrunn av at denne studien er gjort i myotuber der GLUT4 i mindre grad er uttrykt sammenlignet med en tilstand *in vivo*, kan dette også være en årsak til at det ikke observeres forskjeller i glukosemetabolismen for gruppene. Berggren et al. rapporterte imidlertid om et økt basalt glukoseopptak i myotuber fra godt trente sammenlignet med utrente individer ved bruk av 2-deoksy- ^3H glukose [93]. Dette er en annen metode for glukoseopptak/transport som ikke måler fullstendig metabolisme ettersom videre glykolyse er blokkert som følge av en 2-hydroksylgruppe. I tillegg var antallet deltakere høyere i studien til Berggren et al. sammenlignet med studien i denne masteroppgaven, hvilket kan være av betydning for forskjellene i resultatene. Det ble ikke funnet forskjeller mellom gruppene med hensyn på mRNA-ekspressjon *in vitro*. Faktum av disse observasjonene kan bidra i forklaringen på hvorfor det ikke sees noen forskjeller mellom gruppene på glukosemetabolismen.

Funn fra denne studien viste ingen effekter av GW501516 på glukosemetabolismen *in vitro*, og GW-respons på myotuber var lik for atlet- og utrentgruppen. Tidligere er det gjort motstridende funn på glukosemetabolismen etter behandling med GW501516. Feng m.fl. [29] fant at både opptak og oksidasjon av glukose var redusert etter behandling av humane skjelettmuskelceller med GW501516. Dimopoulos et al. fant ingen effekt på glukosemetabolisme i L6 rotte-skjelettmuskelceller [30], mens Krämer et al. observerte høyere opptak av glukose som følge av behandling med GW501516 i C2C12 musemyotuber [115].

4.4 Oljesyremetabolisme

I litteraturen er det rapportert om større andel lipider i tillegg til høyere mitokondriehold i myotuber fra godt trente sammenlignet med celler fra utrente [25]. IMTG i skjelettmuskel fra utholdenhetstrente personer er rapportert høyere sammenlignet med utrente personer, hvilket representerer ”atletparadokset” [25, 26]. Det spekuleres dermed i om lipidmetabolismen i skjelettmuskel hos godt trente personer er annerledes enn hos utrente, og i denne studien var det ønskelig å undersøke denne problemstillingen nærmere.

Resultatene viste at oljesyreoksidasjonen var høyere i myotuber fra atletgruppen sammenlignet med celler fra utrentgruppen. Fraksjonell oljesyreoksidasjon, hvilket betyr andel oljesyreoksidasjon i forhold til opptaket av oljesyre i cellene, var i også høyere for myotuber fra atletgruppen sammenlignet med utrentgruppen, hvilket betyr at oljesyreoksidasjonen er stimulert uten tilsvarende stimulering av opptaket. Tidligere studier har vist tilsvarende effekter av utholdenhetstrening for fettsyreoksidasjon *in vivo* [69, 94], hvilket indikerer at denne egenskapen er bevart *in vitro*. På bakgrunn av at resultatene ikke viste forskjeller for gruppene med hensyn på mRNA-ekspresjon av CYC1, som er et viktig enzym i OXPHOS og for mitokondriefunksjon, kan disse funn potensielt forklares av høyere mitokondriehold og/eller endret sammensetning av mitokondriene i myotuber fra godt trente sammenlignet med utrente personer [40]. Cellenes mitokondriehold og mRNA-ekspresjon av andre viktige enzymer i OXPHOS ble imidlertid ikke bestemt i denne studien, og det er ikke grunnlag for å konkludere utover dette. På en annen side viste resultatene imidlertid ingen forskjeller for myotuber fra gruppene med hensyn på oksidativ reservekapasitet av oljesyreoksidasjonen. Det var i tillegg høyere oksidasjon og β -oksidasjon av oljesyre i atletgruppen sammenlignet med utrentgruppen etter at myotubene var forbehandlet i 24 timer med oljesyre. Disse funnene kan tyde på at utholdenhetstrente

individer på denne måten i større grad evner å regulere metabolismen som følge av større tilgjengelighet på fettsyrer, og at myotuber fra godt trente i større grad prefererer utnyttelse av tilgjengelig substrat enn myotuber fra utrente individer. På bakgrunn av at et større andel fettsyre er lagret i cellene på dette tidspunktet, kan resultatene indikere at lipolyse av IMTG skjer mer effektivt i myotuber fra de godt trente individene, hvilket bør undersøkes. Genekspresjon av PDK4 induseres av høy tilgjengelighet på fettsyrer [17], og på bakgrunn av at det ble funnet tendens til høyere mRNA-ekspresjon av PDK4 i myotuber fra godt trente sammenlignet med utrente i denne studien, kan dette bidra i til høyere oksidasjon av oljesyre i myotuber fra utholdenhetstrente individer. Det er tidligere rapportert om høyere mRNA-ekspresjon av PDK4 som følge av akutt trening og treningsintervensjon [37, 116]. Tendensen til høyere mRNA-ekspresjon for myotuber fra atletgruppen sammenlignet med utrentgruppen var imidlertid kun gjeldene ved korrigering for 36B4, og ikke ved korrigering for GAPDH og gjennomsnittet av de to referansegene. Det er dermed ikke mulig å trekke sikre konklusjoner i forhold til dette. Grunnen til avvikende resultater kan være feilkilder i henhold til pipetteringer og metodeutførelsen.

Det var imidlertid ingen signifikant forskjell mellom gruppene med hensyn på oksidasjon av 400 μM [^{14}C]oljesyre, hvilket tyder på at et platånivå med hensyn på fettsyremetabolismen ble oppnådd ved en såpass høy konsentrasjon av oljesyre. På bakgrunn av at det ikke ble funnet forskjeller for gruppene med hensyn på *in vitro*-parameteren adapterbarhet kan dette indikere at denne egenskapen ikke er avgjørende for reguleringen av IMTG og atletparadokset. På den annen side kan det spekuleres i om *in vitro*-parameteren adapterbarhet er beregnet på en uhensiksmessig måte i denne studien med hensyn på konsentrasjonene av fettsyren.

Det ble det ikke funnet forskjell i mRNA-ekspresjon av CPT1b mellom atlet- og utrentgruppen i denne studien som kan forklare forskjellen mellom gruppene med hensyn på fettsyreoksidasjon, på tross av at dette tidligere er rapportert for studier på biopsi [35, 54]. Dette kan imidlertid være en følge av usikkerhet i metodeutførelsen og donor-variasjoner ettersom grafene kan indikere høyere mRNA-ekspresjon av CPT1b for myotuber fra atletgruppen. I tillegg kan eventuelle forskjeller mellom gruppene i biopsi potensielt ikke være bevart *in vitro*. På den annen side har tidligere studier vist at muskelkontraksjon reduserer nivå av CPT1 inhibitoren malonyl-CoA i skjelettmuskel hos rotte [46], og kan dermed potensielt mediere økt fettsyreoksidasjon. I tillegg medførte en treningsintervensjon til at CPT1 var mindre sensitiv for malonyl-CoA, og videre til høyere fettsyreoksidasjon i skjelettmuskel hos overvektige personer [69]. Denne studien inkluderte imidlertid overvektige

personer i en treningsintervensjon over åtte uker, og indikerte at treningsindusert regulering av malonyl-CoA-nivå kan være av betydning for økt fettsyreoksidasjon. Malonyl-CoA-konsentrasjon i cellene kan være av betydning for forskjellene som sees for myotuber fra atlet- og utrentgruppen, heller enn mRNA-ekspresjon av CPT1b, men konsentrasjon av malonyl-CoA ble imidlertid ikke målt i denne studien. Resultatene viste heller ikke forskjeller i mRNA-ekspresjon av PGC1 α i atletgruppen sammenlignet med utrentgruppen, på tross av dette tidligere er rapporter i litteraturen [54]. Effekt av utholdenhetstrening på fettsyreoksidasjonen i myotuber er trolig et samspill mellom flere faktorer.

Resultatene i denne studien viste at høyere mRNA-ekspresjon av CPT1b, PGC1 α , CD36 og PDK4 i myotuber resulterte i høyere β -oksidasjon av oljesyre. En overskridelse av mitokondriekapasitet er vist å i større grad å resultere i ufullstendig oksidasjon, β -oksidasjon, støtter disse funnene på bakgrunn av at nevnte gener stimulerer metabolismen [117]. I denne studien viste resultatene ingen forskjeller mellom mRNA-ekspresjon av de nevnte genene for myotuber i atlet- og utrentgruppen, og dette kan forklare at det ikke observeres forskjeller med hensyn på β -oksidasjon i myotuber etter fire timer for gruppene.

I denne studien viste resultatene ingen signifikant forskjell i oljesyreopptaket i myotuber for gruppene etter fire timer, men opptaket av oljesyre var imidlertid signifikant høyere i myotuber fra godt trente enn celler fra utrente etter 28 timer. I løpet av fire timer vil fettsyrene i størst grad være lagret som fosfolipider, før reforestring til TAG og lipidintermediater skjer etter en tid. Forskjellen som sees i oljesyreopptaket etter 28 timer kan tyde på at forskjellene først sees på grunnlag av ulik fordeling av fettsyrene intracellulært, og videre at disse mekanismene er viktige i forhold til forståelse av atletparadokset. Bajpeyi et al. rapporterte imidlertid ingen signifikant korrelasjon mellom IMTG *in vivo* og *in vitro* i skjelettmuskelceller [25], hvilket indikerer at ekstracellulære faktorer spiller en viktig rolle i regulering av fettsyreopptak og -lagring *in vivo*. Bajpeyi et al. rapporterte imidlertid høyere lipidinnhold i myotuber fra utholdenhetstrente atleter sammenlignet med utrente personer, slik sett *in vivo* [25]. Resultatene viste negativ sammenheng mellom aerobkapasitet VO₂maks og lipidakkumulering (CA), og på bakgrunn av at oljesyreopptaket i 28 timer var høyere i myotuber fra godt trente enn utrente, gir dette ytterligere indikasjon på at fettsyrer som tas opp av myotuber fra godt trente i større grad oksideres heller enn akkumuleres intracellulært. Selv om ikke data på IMTG i biopsi fra skjelettmuskel ble målt i denne studien, kan funnene indikere at et økt oljesyreopptak *in vivo* er gjenspeilet *in vitro*. mRNA-ekspresjon av CD36, som er en viktig fettsyretransportør, ble rapportert å være høyere i biopsier fra godt trente sammenlignet med utrente individer [54]. I denne studien var det imidlertid ingen signifikant

forskjell i mRNA-ekspresjon av CD36 mellom godt trente og utrente myotuber. Dette kan bidra i forklaringen på at det ikke sees forskjeller mellom atlet- og utrentgruppen med hensyn på fettsyreopptak etter fire timer i denne studien. Samtidig kan dette indikere at mRNA-ekspresjon i større grad er avgjørende for lipidmetabolismen før fetttsyrene lagres intracellulært, og at andre reguleringer har en viktigere rolle etter reforestring av fetttsyrene.

På bakgrunn av at resultatene i denne studien viste høyere fettsyreopptak etter 28 timer, i tillegg til høyere fettsyreoksidasjon for myotuber fra godt trente, kan dette indikere at utholdenhetstrening øker omsetningen ("turnover") av IMTG. Dette er en tidligere foreslått mekanisme bak atletparadokset [50]. Videre kan potensielt høyere oksidasjon i myotuber fra godt trente personer redusere reforestring og/eller lagring av lipidintermediater som kan virke forstyrrende på insulinsignaleren i skjelettmuskel. Lipolyse og reforestring ble imidlertid ikke målt i denne studien, og det er derfor ikke mulig å trekkes sikre konklusjoner angående IMTG-omsetningen ("turnover").

Oksidativ reservekapasitet av oljesyre i myotuber var ikke forskjeller for myotuber fra atlet- og utrentgruppen. Goodpaster et al. observerte høyere, men ingen signifikant forskjell i oksidativ kapasitet bestemt som kvantitativ suksinat-dehydrogenase (kompleks II) i studier gjort på biopsimateriale fra godt trente sammenlignet med utrente individer [26]. I tillegg viste Bajpeyi et al. større mitokondrie kapasitet *in vivo*, målt som maksimal hastighet av ATP-syntese, hos godt trente personer sammenlignet med utrente [25]. Det kan tenkes at denne egenskapen er mindre synlig i differensierte skjelettmuskelceller i forhold til i biopsimateriale og dermed ikke observeres i denne studien. I tillegg er parameterne bestemt på bakgrunn av ulike metoder. Oksidativ reservekapasitet av myotuber fra atletgruppen var ikke påvirket av oljesyrekonentrasjonen, til sammenligning med myotuber fra utrentgruppen som viste signifikant lavere reservekapasitet ved høyere oljesyrekonentrasjon. Dette kan bety at myotuber fra utholdenhetstrente individer i større grad enn utrente bevarer oksidativ reservekapasitet på tross av høy tilgang på fettssyrer. Dette kan tenkes å være en beskyttelsesmekanisme i forhold til fettssyreoverskudd.

Funn fra denne studien viste stimulerende effekt av PPAR δ -agonisten GW501516 på oljesyremetabolismen i myotuber. Opptak, oksidasjon og β -oksidasjon av oljesyre var økt som følge av denne behandlingen. Dette støttes av tidligere funn som har vist at GW501516 oppregulerer oljesyremetabolismen [29, 30, 118]. I litteraturen er det rapportert at stimulering av PPAR δ oppregulerer mRNA-ekspresjon av CD36, PDK4, PGC1 i myotuber [29, 30, 115], hvilket også ble vist i denne studien med hensyn på mRNA-ekspresjon av CD36, PDK4, CPT1a og b etter behandling av myotubene med GW501516. I denne studien var imidlertid

ikke mRNA-ekspresjon av PGC1 α var påvirket av GW-behandling av myotubene. Stimulering av GW501516 på oljesyremetabolismen kan forklares av oppregulering av mRNA-ekspresjon av disse genene. Videre kan faktum av tendens til økt mRNA-ekspresjon av CPT1a i tillegg til signifikant økt mRNA-ekspresjon av CD36 og PDK4 etter GW-behandling av myotuber for begge gruppene, bidra til å forklare PPAR-stimulert oljesyremetabolisme for begge gruppene. GW-respons (%) på oljesyreopptak var imidlertid signifikant lavere for myotuber fra atletgruppen sammenlignet med utrentgruppen. I tillegg viste resultatene en tendens til lavere GW-respons (%) på oljesyreoksidasjon for myotuber fra atletgruppen sammenlignet med myotuber i utrentgruppen. Dette kan potensielt forklares av at fettsyreoksidasjonen var høyere for myotuber fra atletgruppen sammenlignet med utrentgruppen, da det kan tenkes at dette medfører større tilgjengelighet av fettsyrer for myotuber fra utrentgruppen som kan stimulere PPAR. På bakgrunn av at utrente individer utviser større respons av GW501516 kan det tenkes at dette er negativt i forhold høyere lipidopptak og fettsyreakkumulering i cellen, samt manglende evne for å kompensere dette på bakgrunn av lavere fettsyreoksidasjon sammenlignet med godt trente individer. Dette må imidlertid undersøkes nærmere før konklusjoner kan trekkes.

Det spekuleres omkring GW501516 som et aktuelt legemiddel som en "trenings-pille" [17], og resultatene fra denne studien viste økt oljesyreoksidasjon som resultat av GW-behandlingen lik utholdenhetstrening. På den annen side stimulerte PPAR oljesyreopptaket tilsvarende, og det er nødvendig å undersøke effekter av dette faktum. Det ble videre ikke funnet forskjeller mellom metabolismeparametere eller mRNA-ekspresjon etter GW-behandling mellom gruppene, og disse funnene indikerer at substansen ikke har en additiv effekt til utholdenhetstrening. Det kan imidlertid ikke utelukkes at GW501516 har en additiv effekt til trening med hensyn på proteinuttrykk i skjelettmuskel ettersom dette ikke ble målt i denne studien. Resultatene fra denne studien gir indikasjoner på at PPAR og utholdenhetstrening stimulerer metabolismen ved ulike mekanismer.

Resultatene viste en tendens til høyere oljesyreopptak som følge av behandling med Tularik som er en LXR-agonist, et potensielt legemiddelmål. I tillegg var både akkumulering og oksidasjon av oljesyre i myotuber signifikant høyere etter behandling med Tularik. Funnene samsvarer med studier rapportert av Kase et al. som har vist at behandling av myotuber med Tularik resulterte i økt opptak, akkumulering og oksidasjon av fettsyrer [79, 119]. Myotuber fra atletgruppen viste ingen påvirkning på akkumulering av oljesyre som resultat av behandling med Tularik, til forskjell for myotuber fra utrentgruppen som viste tendens til økt akkumulering av oljesyre. Oljesyreoksidasjonen var økt etter behandling for myotuber fra

utrentgruppen, mens det var tendens til det samme for myotuber fra atletgruppen. Disse funn viser at Tularik i større grad øker lipidopptak hos utrente individer, mens påvirkning på oljesyreoksidasjon er mer lik for myotuber fra godt trente og utrente individer. Kase et al. observerte høyere lipidakkumulering *in vitro* for pasienter med T2D sammenlignet med slanke individer. På bakgrunn av dette antas LXR-effekter å være avhengig av donorkarakteristika. Disse funnene indikerer at myotuber fra atlet- og utrentgruppen i denne studien viser lignende Tularik-effekt som muskelceller slanke og T2D-pasienter [79]. Faktum at LXR stimulerer fettsyremetabolismen generelt i tillegg til at effektene synes å være påvirket av donorkarakteristika kan være avgjørende for reseptoren som et farmakologisk legemiddelmål, og det vil være nødvendig å undersøke effekter av lipidakkumuleringen. I tillegg kan det kan det potensielt være et samspill mellom LXR og PPAR i myotuber ved at fettsyreakkumuleringen, mediert av Tularik, stimulerer PPAR til økt fettsyreopptak og -oksidasjon. Potensielt kan mekanismer som inkluderer PPAR og LXR være viktige for reguleringen av IMTG og utviklingen av insulinresistens, og dette er mekanismer som bør undersøkes videre.

4.5 Metabolsk fleksibilitet

I litteraturen er det vist positiv sammenheng (korrelasjon) mellom metabolsk fleksibilitet og utholdenhetskapasitet (VO_2 maks), i tillegg til at metabolsk fenotype bevares *in vitro* på tross av at cellene mister ekstracellulær kommunikasjon [96]. Dette indikerer at metabolsk fleksibilitet er en iboende egenskap til skjelettmuskel, og på bakgrunn av dette var det ønskelig å undersøke forskjeller i metabolsk fleksibilitet for myotuber fra atlet- og utrentgruppen. Ukropcova et al. rapporterte at adapterbarhet (%) i myotuber er positivt korrelert til henholdsvis metabolsk fleksibilitet *in vivo* og insulinsensitivitet [96]. Resultatene i denne studien viste imidlertid at myotuber hadde evne til å øke oljesyreoksidasjonen og -opptaket ved økende konsentrasjon av oljesyre (100 μ M til 400 μ M) uavhengig av individets treningshistorie, og resultatene viste ingen forskjell med hensyn på adapterbarhet for myotuber fra atlet- og utrentgruppen. *In vitro*-parameteren adapterbarhet er imidlertid kalkulert ut fra forskjellige konsentrasjoner av oljesyre i denne studien enn hva som ble gjort i studien til Ukropcova et al., og potensielt uhensiktsmessige konsentrasjoner av oljesyre til kalkulering av *in vitro*-parameteren er en mulig årsak til at det ikke oppdages forskjeller for gruppene. Resultatene viste positiv korrelasjon mellom oksidasjon av 400 μ M oljesyre og mRNA-ekspresjon av PGC1 α i myotuber, og dette kan indikere at PGC1 α spiller en viktig

rolle i forbindelse med evne til å øke fettsyreoksidasjon ved økt fettsyretilgjengelighet. På bakgrunn av at det ikke ble funnet forskjell mellom myotuber fra atlet- og utrentgruppen med hensyn på mRNA-ekspresjon av PGC1 α kan dette inngå i forklaringen på at det ikke sees forskjeller mellom gruppene med hensyn på adapterbarhet.

Glukosesuppresjon (%), manglende evne til å opprettholde fettsyreoksidasjon i nærvær av glukose, er tenkt å være negativt i forhold til metabolsk fleksibilitet, og Ukropcova et al. fant at glukosesuppresjon (%) i myotuber var negativ korrelert til henholdsvis metabolsk fleksibilitet *in vivo* og insulinsensitivitet [96]. Resultatene fra denne studien indikerte lavere glukosesuppresjon (%) som resultat av trening, men det var ingen signifikant forskjell mellom godt trente og utrente individer. Resultatene viste positiv korrelasjon mellom glukosesuppresjon (%) og mRNA-ekspresjon av CYC1, samt negativ korrelasjon mellom glukosesuppresjon (%) og henholdsvis mRNA-ekspresjon av CD36 og CPT1b. Som tidligere nevnt, er CD36 og CPT1b viktige for opptak og oksidasjon av fettsyrer [23, 89], og økt mRNA-ekspresjon av disse genene vil fremme fettsyremetabolismen, hvilket støtter korrelasjonene.

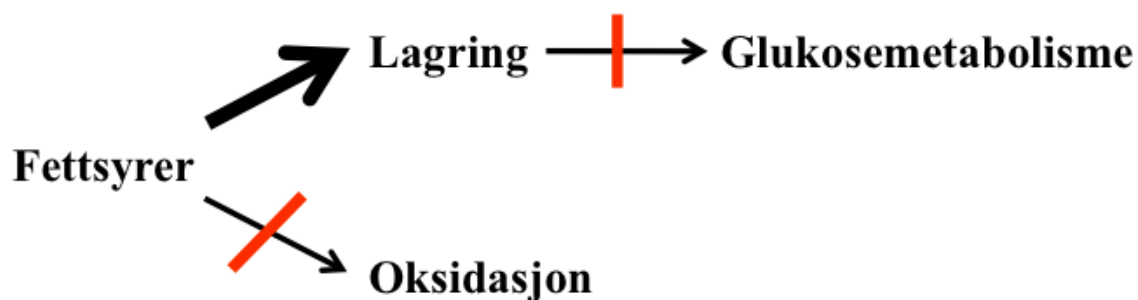
Resultatene viste at tilstedeværelse (akuttbehandling) av oljesyre eller glukose medførte signifikant reduksjon av henholdsvis glukose- og oljesyreoksidasjonen for myotuber fra atletgruppen. Dette kan forklares av hypotesen til Randle et al. om gjensidig påvirkning av glukose og fettsyre for TCA-syklusen [58]. Tilsvarende observasjoner var imidlertid ikke signifikante for myotuber fra utrentgruppen, men det var tendens til reduksjon av oljesyreoksidasjon ved akuttbehandling med glukose. Resultatene viste positiv korrelasjon mellom oljesyreoksidasjon i fire timer etter tilstedeværelse (akuttbehandling) av ikke-radioaktiv glukose og mRNA-ekspresjon av CPT1b. Dette kan indikere at mRNA-ekspresjon av CPT1b bidrar til å opprettholde fettsyreoksidasjonen på tross av tilgjengelighet av glukose. Da det ikke ble funnet signifikante forskjeller for gruppene i mRNA-ekspresjon av CPT1b kan dette forklare at begge gruppene viste lik evne til å redusere oljesyreoksidasjonen ved tilstedeværelse av ikke-radioaktiv glukose.

Resultatene viste videre at oljesyresuppresjon (%) for myotuber fra atletgruppen var signifikant høyere sammenlignet med myotuber fra utrentgruppen. Dette indikerer at utholdenhetstrening i større grad prefererer oksidasjon av fettsyrer på tross av glukosetilgjengelighet. Disse funn støttes også av at godt trente personer er rapportert å ha lavere RER-verdi [99] selv om det ikke ble observert forskjeller for gruppene med hensyn på RER-verdi i denne studien. Observasjonene indikerer at skjelettmuskelceller fra godt trente atleter i større grad er metabolsk fleksible sammenlignet med utrente, og på bakgrunn av dette

at trening har positiv innvirkning på metabolsk fleksibilitet av skjelettmuskel. Meex et al. rapporterte bedre metabolsk fleksibilitet av skjelettmuskel *in vivo* hos slanke individer sammenlignet med type 2-diabetikere, men at en 12-ukers treningsintervensjon ikke påvirket parameteren for slanke individer [120]. Denne studien bestemte imidlertid metabolsk fleksibilitet *in vivo* karakterisert som evne til å øke insulinstimulert glukoseoksidasjon og suppresjon av fettsyreoksidasjonen for en relativ kort periode, mens studien i denne oppgaven har undersøkt effekter av livslang utholdenhetstrening som ulike *in vitro*-korrelat. På bakgrunn av det ikke sees signifikante forskjeller i mRNA-ekspresjon *in vitro* som følge av en livslang treningsperiode kan det videre spekuleres i om skjelettmuskels evne til å tilpasse seg metabolske miljøer, og herunder metabolske fleksibilitet med hovedvekt på oljesuppresjon (%) på glukoseoksidasjonen i myotuber, er spesielt viktig for effekter av utholdenhetstrening. På en annen side er ikke proteinuttrykk målt i denne studien, og det kan hende det foreligger forskjeller mellom gruppene på gennivå. Skjelettmuskulens evne til å tilpasse seg etter metabolske miljøer er trolig årsak av et komplekst samspill av flere viktige faktorer, og dette bør undersøkes nærmere.

4.6 Effekter på energimetabolismen i myotuber etter behandling med tetradecyltiopropionsyre (TTP)

Det er vist i studier at TTP både blokkerer fettsyreoksidasjonen og medfører lipidakkumulering i leverceller fra rotter til utvikling av nonalkoholisk fettlever [81, 82]. Hypotesen i forbindelse med denne studien (illustrert i figur 4.1) var at denne lipidakkumuleringen også ville forekomme i skjelettmuskelceller som følge av TTP-behandling, og at dette videre kunne føre til forstyrrelse i glukosemetabolismen i form av redusert glukoseoksidasjon.



Figur 4.1: Hypotetisk effekt av TTP i skjelettmuskelceller. Hypotesen var at TTP inhiberte fettsyreoksidasjonen og medførte økt lipidakkumulering i skjelettmuskelceller, slik som observert i leverceller fra rottestudier [81, 82]. Følger av dette ble antatt å kunne være redusert glukoseoksidasjon som følge av lipidakkumuleringen.

Hovedtanken bak forsøkene med TTP var i hovedsak som en potensiell testsubstans, og dermed ble det i størst grad fokuset på behandlingseffekter av TTP heller enn forskjeller for atlet- og utrentgruppen. Myotuber fra atletgruppen viste imidlertid like effekter som myotuber fra utrentgruppen som følge av behandling med TTP. I en situasjon der differensierte skjelettmuskelceller hadde vært behandlet med TTP i det siste døgnet av differensieringsperioden, og oljesyremetabolismen ble bestemt i løpet av fire timer uten tilstedeværelse av TTP i mediet, ble det observert både høyere oljesyreopptak og -oksidasjon. I en annen situasjon der TTP var tilstede i mediet da oljesyremetabolisme ble bestemt over fire timer, så imidlertid opptak og oksidasjon til å være redusert. I litteraturen er effekt av TTP rapportert å være akutt innsettende [81]. Forsøkene der TTP var tilstede under metabolismebestemmelsen ble det imidlertid bare utført som to uavhengige forsøk, og på bakgrunn av dette er det ikke nok grunnlag for å trekke konklusjoner. Likevel, gir disse observasjonene indikasjoner på at TTP fører til ulik regulering avhengig av behandlingstid og tilstedeværelse. Det kan spekuleres i om TTP utøver effekt via PPAR i skjelettmuskel, og at effekten som sees i form av økt fettsyreoksidasjon og -opptak etter behandling i 24 timer, er forårsaket av effekter i form av en PPAR-agonist eller at fettsyre opphopning som følge av TTP stimulerer PPAR. Tidligere funn støtter sistnevnte da TTP ga 2,5-gangers økning i PPAR-aktivering sammenlignet med kontroll i leverceller fra rotte [121]. På bakgrunn av dette konkluderte denne studien med TTP som like potent PPAR-aktivaror som andre fettsyrer. I en situasjon der myotuber hadde vært behandlet med TTP i det siste døgnet av differensieringsperioden og glukosemetabolismen ble undersøkt uten TTP i mediet, var det ingen påvirkning av TTP på verken opptak- eller oksidasjon av glukose. Derimot ble det observert redusert oksidasjon av glukose ved tilstedeværelse av TTP i fire timer da glukosemetabolismen ble bestemt. Ut fra dette kan det tenkes at TTP innehar den hypotetiske virkningen på glukoseoksidasjon ved tilstedeværelse under metabolismebestemmelsen, men på bakgrunn av at forsøksoppsettet der TTP var tilstede i mediet under inkuberingen kun ble utført for to ulike donorer, kan konklusjoner ikke trekkes i forhold til dette. Det kan diskuteres om radioaktiv oljesyre alene er tilstrekkelig kontroll i forhold til å studere TTP-effekt på fettsyremetabolismen da det potensielt kan være en konkurranseeffekt mellom de to fettsyrene. Denne effekten/usikkerheten kunne vært redusert ved å bestemme oljesyreoksidasjonen etter behandling med en annen fettsyre som ligner TTP, for eksempel palmitinsyre (som også er en mettet fettsyre). Resultatene fra forsøkene der TTP var tilstede under inkuberingen viser både redusert opptak og oksidasjon av oljesyre, og dette kan være

årsak av konkurranseeffekt mellom fettsyrene. Det kan imidlertid også være at inhibert oksidasjon resulterer i at myotubene kompenserer for dette ved å redusere oljesyreopptaket. Resultatene viste at tilstedeværelse av oljesyre reduserte glukoseoksidasjonen, og faktum av dette gjør at radioaktiv glukose uten tilstedeværelse av fettsyre potensielt ikke er tilstrekkelig for å studere effekter av TTP-behandlingen. En kontroll av glukose ved tilstedeværelse av palmitinsyre kunne korrigert for en mulig suppresjonseffekt av TTP på glukoseoksidasjonen.

4.7 Fibertypefordeling i skjelettmuskel

I denne studien var prosentandel fibertype 1 høyere i biopsi fra utholdenhetsrente personer sammenlignet med utrente individer, men dette var ikke signifikant. Det samme var tilfellet for fibertypefordelingen *in vitro* målt som mRNA-ekspresjon av MYH7 og MYH2. Det er ikke kjent at en slik problemstilling tidligere er undersøkt i en *in vitro*-cellemodell, men tidligere studier har imidlertid rapportert høyere andel fibertype 1 i biopsi fra atleter sammenlignet med biopsi fra utrente [122], i tillegg til høyere prosentandel fibertype 1 etter en treningsintervensjon [35]. Disse observasjonene støtter ikke-signifikante funn i denne studien. Det foreligger imidlertid varierende funn i forbindelse med trening og påvirkning av fibertypefordeling av skjelettmuskel *in vivo*. Simoneau et al. rapporterte om endret fibertypefordeling i biopsi fra utrente individer etter en 15-ukers treningsperiode [14], mens Gollnick et al. rapporterte om ingen endring i fibertypefordeling i biopsi fra tidligere aktive individer etter en treningsperiode på fem måneder [13]. I denne studien ble det ikke funnet noen sammenheng mellom VO_2 maks og prosentandel fibertype 1 i biopsier fra skjelettmuskel, hvilket ikke støtter hypotesen om at utholdenhets trening resulterer i større andel fibertype 1 i skjelettmuskel. I litteraturen er det rapportert at skjelettmuskel fra langdistanseløpere består av høyere prosentandel fibertype 1 enn fibertype 2 sammenlignet med det motsatte for sprintløpere [123], og det kan spekuleres i om valg av idrettsgren er genetisk betinget eller om fibertypefordelingen er resultat av treningstypen. Potensielt kan det være slik at et individ, der prosentandel fibertype 1 dominerer i skjelettmuskel, vil ha bedre utgangspunkt for å lykkes som langdistanseløper, og dermed retter treningen sin mot dette, sammenlignet med et individ der skjelettmuskel i større grad består av fibertype 2, som vil ha bedre utgangspunkt for å lykkes som sprintløper.

I denne studien viste resultatene ingen forskjeller i energimetabolisme for gruppeinndeling etter biopsi av høyest prosentandel fibertype 1 sammenlignet med høyest prosentandel fibertype 2. Det var imidlertid en tendens til positiv korrelasjon mellom prosentandel fibertype 1 *in vivo* og maksimal oksidasjonskapasitet av oljesyre *in vitro* (oksidasjon etter FCCP-behandling). I tillegg korrelerte mRNA-ekspresjon av MYH7 (markør for fibertype 1) positivt med β -oksidasjon i differensierte skjelettmuskelceller. Disse funnene støttes av at fibertype 1 har større kapasitet til opptak- og oksidasjon av fettsyrer [6, 9]. Fibertypefordeling av skjelettmuskel kan tenkes å ha en påvirkning på energimetabolismen, men resultatene tyder på at andre faktorer som for eksempel utholdenhetskapasitet har en viktigere rolle. Det var videre ingen signifikant sammenheng mellom fibertypefordeling *in*

vivo og *in vitro* i denne studien. Det var imidlertid god samvariasjon mellom prosentandel fibertype *in vivo* og *in vitro* for henholdsvis 12 av donorene, men spesielt to av donorene var avvikende for korrelasjonen. Usikkerhet i forhold til fibertypebestemmelse fra både biopsi og ved mRNA-ekspresjon kan være faktorer av betydning for at dette ikke observeres. I tillegg kan faktum av at mRNA-ekspresjon *in vitro* av fibertype 2X ikke er bestemt i denne oppgaven, og dermed ikke inngår i totalbildet, spille en rolle for resultatene som er presentert. Faktum av generelt høyere ekspresjon av type 2-fibre enn type 1-fibre i myotuber [84] er sannsynligvis en faktor av betydning for at resultatene ikke viste signifikant korrelasjon mellom *in vivo*- og *in vitro*-data. I tillegg kan faktum av at det er målt mRNA-ekspresjon og ikke proteinuttrykk også være en årsak til at det ikke ble funnet en signifikant korrelasjon mellom dataene.

4.8 *In vivo-in vitro*-korrelasjonsvurderinger

Utholdenhetstrening har vist å ha positiv effekt på lipoproteinprofilen *in vivo* [24]. Det ble funnet at høyere nivå av serum-HDL kolesterol tenderte til positiv korrelasjon med hensyn på oljesyreopptak og signifikant positiv korrelasjon med hensyn på oljesyreoksidasjon. I tillegg viste nivå av serum-LDL kolesterol tendes til negativ korrelasjon med oljesyreoksidasjon. Resultatene indikerer at lipidprofil er av betydning for lipidmetabolismen i myotuber. Det var imidlertid ingen signifikante forskjeller i disse *in vivo*-lipidparameterne for atlet- og utrentgruppen som kan forklare forskjellene i oljesyremetabolismen *in vitro*.

4.9 Veien videre

På bakgrunn av begrenset tid i masterperioden ble det prioritert å gjøre substratoksidasjonsforsøk, proteinmåling, analyse av syreløselige metabolitter (ASM) og qPCR for donorene som var til rådighet. Videre vil det være ønskelig å utføre "scintillation proximity assay"-forsøk for alle donorer, og dermed undersøke lipidmetabolisme i forhold til fettsyreakkumulering, lipolyse og reforestring i de samme celler ved ulike tidspunkt. Det kan da undersøkes om tidskurver med hensyn på disse parameterne arter seg forskjellig for myotuber fra atlet- og utrentgruppen. Samtidig kan det være fordelaktig å benytte tynnsjikt-kromatografi for å undersøke intracellulær lipidfordeling etter for eksempel 28 timer for å se etter forskjeller som kan bidra til større forståelse omkring IMTG og atletparadokset. For å presse cellene til økt mitokondriell oksidasjon (remodellere cellene) vil det være mulig å behandle cellene med galaktose. Det kan også være aktuelt å behandle myotuber med FCCP og bestemme glukosemetabolisme, for å blant annet kunne beregne oksidativ reservekapasitet for glukoseoksidasjon, og videre undersøke om denne parameteren er forskjellig i myotuber fra godt trente og utrente individer. For å undersøke oljesyreoksidasjonen ytterligere kan det være nyttig å måle proteinekspresjon av mitokondrielle proteiner ved hjelp av Western blotting på prøver de samme donorene. I senere studier vil det være aktuelt å behandle myotuber med kronisk lavfrekvent elektrisk pulsstimulering som er en metode for *in vitro* utholdenhetstrening for å se på eventuelle metabolske forskjeller mellom gruppene. I tillegg kunne det være fordelaktig å inkludere celler fra flere individer slik at studiepopulasjonen øker. Særlig ville det vært gunstig å inkludere flere deltakere med lav utholdenhetskapasitet, slik at gruppeforskjellene i henhold til VO_2 maks øker. Det gjøres for tiden studier av proteinekspresjon i biopsimateriale for de samme donorene ved Norges idrettshøgskole, og det vil det være interessant å sammenligne disse funnene med våre celledata.

5 Konklusjon

Funn fra denne studien tyder på at lipidmetabolismen i større grad enn glukosemetabolismen er endret i myotuber fra atleter sammenlignet med myotuber fra utrente individer. Myotuber fra utholdenhetstrente individer har høyere oljesyreopptak og høyere fettsyreoksidasjon enn celler fra utrente individer. I tillegg viste studien at myotuber fra trente individer hadde økt metabolsk fleksibilitet, målt som oljesyresuppresjon på glukosemetabolismen, enn myotuber fra utrente individer. Oksidativ reservekapasitet for fettsyreoksidasjonen ikke var forskjellig mellom celler fra godt trente og utrente personer. Myotuber fra utholdenhetstrente personer hadde en ikke-signifikant høyere mRNA-ekspresjon av utvalgte gener sammenlignet med myotuber fra utrente personer.

Effekter av potensielle farmakologiske agens, PPAR δ -agonisten GW501516 og LXR-agonisten Tularik hadde dels ulike effekter i myotuber fra de to gruppene. Både GW501516 og Tularik stimulerte fettsyremetabolismen for begge gruppene, begge med en tendens til høyere effekt i myotuber fra den utrente gruppen. Studien viste ingen signifikante forskjeller mellom atletgruppen og utrentgruppen med hensyn på mRNA-ekspresjon i myotuber, hvilket også var tilfellet etter PPAR-stimulering. Behandling av myotuber med 4-tiafettsyreanalogen TTP i 24 timer ga økt opptak og oksidasjon av oljesyre i begge gruppene, og viste dermed ingen effekt som testsubstans for studier av fettsyreakkumulering og mulig inhibert glukoseoksidasjon.

I denne studien syntes ikke fibertypefordeling i skjelettmuskelbiopsien å være gjenspeilet i fibertypefordeling i myotuber målt som mRNA-ekspresjon, og heller ikke for energimetabolismen i cellene. Kliniske parametere som VO₂maks og lipidprofil synes å være av betydning for lipidmetabolisme i myotuber, hvilket tyder på at *in vivo*-egenskaper i en viss grad er bevart *in vitro* i myotuber. For å kunne trekke endelige konklusjoner om effekter av utholdenhetstrening og bakenforliggende mekanismer til atletparadokset trengs imidlertid ytterligere metabolske studier på muskelcellene.

Litteraturliste

1. Thoresen, G., et al., *Metabolic switching of human skeletal muscle cells in vitro*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2011. **85**(5): p. 227-234.
2. Greising, S.M., et al., *Systems Biology of Skeletal Muscle: Fiber Type as an Organizing Principle*. Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine, 2012. **4**(5): p. 457-473.
3. Bárány, M., *ATPase Activity of Myosin Correlated with Speed of Muscle Shortening*. The Journal of General Physiology, 1967. **50**(6): p. 197-218.
4. Watt, M.J. & Hoy, A.J., *Lipid metabolism in skeletal muscle: generation of adaptive and maladaptive intracellular signals for cellular function*. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism 2012. **302**(11): p. 1315-1328.
5. Aas, V., et al., *Are cultured human myotubes far from home?* Cell Tissue Res, 2013. **354**(3): p. 671-682.
6. Turner, N., et al., *Fatty acid metabolism, energy expenditure and insulin resistance in muscle*. Journal of Endocrinology, 2014. **220**(2): p. 61-79.
7. Staron, R.S., et al., *Fiber type composition of the vastus lateralis muscle of young men and women*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2000. **48**(5): p. 623-629.
8. Zierath, J.R. & Hawley, J.A., *Skeletal muscle fiber type: influence on contractile and metabolic properties*. PLoS Biology, 2004. **2**(10): p. 348.
9. Stuart, C.A., et al., *Slow-twitch fiber proportion in skeletal muscle correlates with insulin responsiveness*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2013. **98**(5): p. 2027-2036.
10. Shi, S., et al., *Pressing the nerve alters muscle fiber types of the peroneus longus in rats: preliminary evidence for external anal sphincteroplasty*. Med Sci Monit, 2014. **20**: p. 752-7.
11. Murgia, M., et al., *Ras is involved in nerve-activity-dependent regulation of muscle genes*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(3): p. 142-147.
12. Wang, Y.-X., et al., *Regulation of Muscle Fiber Type and Running Endurance by PPAR δ* . PLoS Biology, 2004. **2**(10): p. 294.
13. Gollnick, P.D., et al., *Effect of training on enzyme activity and fiber composition of human skeletal muscle*. Journal of Applied Physiology, 1973. **34**(1): p. 107-111.
14. Simoneau, J.A., et al., *Human skeletal muscle fiber type alteration with high-intensity intermittent training*. European Journal of Applied Physiology, 1985. **54**(3): p. 250-253.
15. Ingalls, C.P., *Nature vs. nurture: can exercise really alter fiber type composition in human skeletal muscle?* Journal of Applied Physiology, 2004. **97**(5): p. 1591-1592.
16. Chen, W., et al., *A metabolomic study of the PPARdelta agonist GW501516 for enhancing running endurance in Kunming mice*. Sci Rep, 2015. **5**.
17. Ehrenborg, E. & Krook, A., *Regulation of skeletal muscle physiology and metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor delta*. Pharmacol Rev, 2009. **61**(3): p. 373-393.
18. Dashty, M., *A quick look at biochemistry: carbohydrate metabolism*. Clin Biochem, 2013. **46**(15): p. 1339-1352.
19. Tremblay, F., et al., *Regulation of GLUT4 traffic and function by insulin and contraction in skeletal muscle*. Frontiers in Bioscience, 2003. **8**: p. 1072-1084.

20. Klip, A. & Paquet, M.R., *Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation*. Diabetes Care, 1990. **13**(3): p. 228-243.
21. Goodyear, L.J. & Kahn, B.B., *Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity*. Annu Rev Med, 1998. **49**: p. 235-261.
22. Shaw, C.S., et al., *HSL and ATGL: the movers and shakers of muscle lipolysis*. The Journal of Physiology, 2013. **591**(24): p. 6137-6138.
23. Rasmussen, B.B. & Wolfe, R.R., *Regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle*. Annu Rev Nutr, 1999. **19**: p. 463-484.
24. Halverstadt, A., et al., *Endurance exercise training raises high-density lipoprotein cholesterol and lowers small low-density lipoprotein and very low-density lipoprotein independent of body fat phenotypes in older men and women*. Metabolism, 2007. **56**(4): p. 444-450.
25. Bajpeyi, S., et al., *Lipid in skeletal muscle myotubes is associated to the donors' insulin sensitivity and physical activity phenotypes*. Obesity (Silver Spring), 2014. **22**(2): p. 426-434.
26. Goodpaster, B.H., et al., *Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes*. Journal of clinical endocrinology & metabolism, 2001. **86**(12): p. 5755-5761.
27. Bonen, A., et al., *Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14501-14508.
28. Schwenk, R.W., et al., *Fatty acid transport across the cell membrane: regulation by fatty acid transporters*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2010. **82**(4-6): p. 149-154.
29. Feng, Y.Z., et al., *PPARdelta activation in human myotubes increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity and reduces glucose utilization by a switch in substrate preference*. Arch Physiol Biochem, 2014. **120**(1): p. 12-21.
30. Dimopoulos, N., et al., *The PPARdelta agonist, GW501516, promotes fatty acid oxidation but has no direct effect on glucose utilisation or insulin sensitivity in rat L6 skeletal muscle cells*. FEBS Lett, 2007. **581**(24): p. 4743-4748.
31. Aon, M.A., et al., *Mitochondrial and cellular mechanisms for managing lipid excess*. Front Physiol, 2014. **5**(282).
32. Walther, T.C. & Farese, R.V., *The life of lipid droplets*. Biochimica et biophysica acta, 2009. **1791**(6): p. 459-466.
33. Greiwe, J.S., et al., *Effects of endurance exercise training on muscle glycogen accumulation in humans*. The Journal of Applied Physiology, 1999. **87**(1): p. 222-226.
34. Kraniou, G.N., et al., *Acute exercise and GLUT4 expression in human skeletal muscle: influence of exercise intensity*. Journal of Applied Physiology, 2006. **101**(3): p. 934-937.
35. Russell, A.P., et al., *Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle*. Diabetes, 2003. **52**(12): p. 2874-2881.
36. Corpeleijn, E., et al., *Metabolic flexibility in the development of insulin resistance and type 2 diabetes: effects of lifestyle*. Obesity reviews, 2009. **10**(2): p. 178-193.
37. Barrès, R., et al., *Acute Exercise Remodels Promoter Methylation in Human Skeletal Muscle*. Cell Metabolism, 2012. **15**(3): p. 405-411.

38. Egan, B. & Zierath, Juleen R., *Exercise Metabolism and the Molecular Regulation of Skeletal Muscle Adaptation*. Cell Metabolism, 2013. **17**(2): p. 162-184.
39. Hood, D.A., et al., *Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle*. Journal of Experimental Biology, 2006. **209**(Pt 12): p. 2265-2275.
40. Holloszy, J.O., *Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle*. Journal of biological chemistry, 1967. **242**(9): p. 2278-2282.
41. Schrauwen, P. & Hesselink, M.K., *Oxidative capacity, lipotoxicity, and mitochondrial damage in type 2 diabetes*. Diabetes, 2004. **53**(6): p. 1412-1417.
42. Terada, H., *Uncouplers of oxidative phosphorylation*. Environmental Health Perspectives, 1990. **87**: p. 213-218.
43. Liang, H. & Ward, W.F., *PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism*. Adv Physiol Educ, 2006. **30**(4): p. 145-151.
44. Jørgensen, S.B., et al., *Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise*. The Journal of Physiology, 2006. **574**(Pt 1): p. 17-31.
45. Hardie, D.G., et al., *AMP-activated protein kinase: a target for drugs both ancient and modern*. Chem Biol, 2012. **19**(10): p. 1222-1236.
46. Park, H., et al., *Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(36): p. 32571-32577.
47. Kirchner, H., et al., *Epigenetic flexibility in metabolic regulation: disease cause and prevention?* Trends Cell Biol, 2013. **23**(5): p. 203-209.
48. Nitert, M.D., et al., *Impact of an exercise intervention on DNA methylation in skeletal muscle from first-degree relatives of patients with type 2 diabetes*. Diabetes, 2012. **61**(12): p. 3322-3332.
49. Pan, D.A., et al., *Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action*. Diabetes, 1997. **46**(6): p. 983-988.
50. Stannard, S.R. & Johnson, N.A., *Insulin resistance and elevated triglyceride in muscle: more important for survival than 'thrifty' genes?* The Journal of Physiology, 2004. **554**(3): p. 595-607.
51. Kelley, D.E. & Mandarino, L.J., *Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination*. Diabetes, 2000. **49**(5): p. 677-683.
52. Amati, F., et al., *Skeletal muscle triglycerides, diacylglycerols, and ceramides in insulin resistance: another paradox in endurance-trained athletes?* Diabetes, 2011. **60**(10): p. 2588-2597.
53. Jin, Y., et al., *Diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2) and monoacylglycerol acyltransferase-2 (MGAT2) interact to promote triacylglycerol synthesis*. Journal of Biological Chemistry, 2014. **289**(41): p. 28237-1048.
54. Koves, T.R., et al., *PPARgamma coactivator-1alpha contributes to exercise-induced regulation of intramuscular lipid droplet programming in mice and humans*. J Lipid Res, 2013. **54**(2): p. 522-534.
55. Watt, M.J. & Spriet, L.L., *Triacylglycerol lipases and metabolic control: implications for health and disease*. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 2010. **299**(2): p. 162-168.
56. Alsted, T.J., et al., *Contraction-induced lipolysis is not impaired by inhibition of hormone-sensitive lipase in skeletal muscle*. Journal of Physiology, 2013. **591**(20): p. 5141-5155.

57. Moro, C., et al., *Determinants of intramyocellular triglyceride turnover: implications for insulin sensitivity*. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 2008. **294**(2): p. 203-213.
58. Randle, P.J., et al., *The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus*. Lancet, 1963. **1**(7285): p. 785-789.
59. World Health Organization, *Global status report on noncommunicable diseases 2010*. 2011, World Health Organization: Geneva.
60. Hollung, K., et al., *The importance of adipose tissue for development of obesity and diabetes mellitus type 2*. Tidsskrift for den norske legeforening, 2003. **123**(3): p. 311-314.
61. *Endurance Exercise Training Up-Regulates Lipolytic Proteins and Reduces Triglyceride Content in Skeletal Muscle of Obese Subjects*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2013. **98**(12): p. 4863-4871.
62. Saltiel, A.R., *Series Introduction: The molecular and physiological basis of insulin resistance: emerging implications for metabolic and cardiovascular diseases*. Journal of Clinical Investigation, 2000. **106**(2): p. 163-164.
63. Kaur, J., *A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome*. Cardiology Research and Practice, 2014. **2014**.
64. Sir George Alberti, P.Z., Jonathan Shaw, Scott M. Grundy, *The IDF consensus worldwide definition of the Metabolic Syndrome*. 2006: Brussel, Belgium.
65. Alberti, K.G., et al., *The metabolic syndrome - A new worldwide definition*. Lancet, 2005. **366**(9491): p. 1059-1062.
66. Claudi, T.e.a., *Diabetes - Nasjonal faglig retningslinje - Forebygging, diagnostikk og behandling*. Vår 2009, Helsedirektoratet.
67. World Health Organization, *Diabetes - Fact sheet N°312*. 2015, World Health Organization.
68. Helsedirektoratet. *HbA1c som diagnostikum for diabetes*. 2012 [cited 2015 01.05]; Available from: <http://legeforeningen.no/PageFiles/104318/endelig%20brev%20til%20legene%20HbA1c.pdf>.
69. Bruce, C.R., et al., *Endurance training in obese humans improves glucose tolerance and mitochondrial fatty acid oxidation and alters muscle lipid content*. The American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 2006. **291**(1): p. 99-107.
70. Schrauwen, P., et al., *Mitochondrial dysfunction and lipotoxicity*. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2010. **1801**(3): p. 266-271.
71. Wang, Y.-X., *PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases*. Cell Research, 2010. **20**(2): p. 124-137.
72. Burri, L., et al., *The Role of PPAR Activation in Liver and Muscle*. PPAR Research, 2010. **2010**.
73. Auwerx, J., et al., *PPAR- γ : a thrifty transcription factor*. Nuclear Receptor Signaling, 2003. **1**.
74. Robciuc, M.R., et al., *Angiopoietin-like 4 mediates PPAR delta effect on lipoprotein lipase-dependent fatty acid uptake but not on beta-oxidation in myotubes*. PLoS One, 2012. **7**(10).
75. Foreningen for utgivelse av Norsk legemiddelhåndbok, *Norsk legemiddelhåndbok for helsepersonell*. 2010: Foreningen for utgivelse av Norsk legemiddelhåndbok.

76. Cefalu, W.T., *Pharmacotherapy for the treatment of patients with type 2 diabetes mellitus: rationale and specific agents*. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2007. **81**(5): p. 636-49.
77. Caton, P.W., et al., *PPARalpha-LXR as a novel metabolostatic signalling axis in skeletal muscle that acts to optimize substrate selection in response to nutrient status*. Biochemical Journal, 2011. **437**(3): p. 521-30.
78. Hessvik, N.P., et al., *LXR{beta} is the dominant LXR subtype in skeletal muscle regulating lipogenesis and cholesterol efflux*. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 2010. **298**(3): p. 602-613.
79. Kase, E.T., et al., *Skeletal muscle lipid accumulation in type 2 diabetes may involve the liver X receptor pathway*. Diabetes, 2005. **54**(4): p. 1108-1115.
80. Skrede, S., et al., *Effects of tetradecylthiopropionic acid and tetradecylthioacrylic acid on rat liver lipid metabolism*. Biochemical Journal, 1995. **305**(2): p. 591-597.
81. Hovik, R., et al., *Effects of thia-substituted fatty acids on mitochondrial and peroxisomal beta-oxidation. Studies in vivo and in vitro*. Biochemical Journal, 1990. **270**(1): p. 167-173.
82. Berge, R.K., et al., *Alkylthio acetic acids (3-thia fatty acids)--a new group of non-beta-oxidizable peroxisome-inducing fatty acid analogues--II. Dose-response studies on hepatic peroxisomal- and mitochondrial changes and long-chain fatty acid metabolizing enzymes in rats*. Biochem Pharmacol, 1989. **38**(22): p. 3969-3979.
83. Asiedu, D.K., et al., *Hepatic fatty acid metabolism as a determinant of plasma and liver triacylglycerol levels. Studies on tetradecylthioacetic and tetradecylthiopropionic acids*. European Journal of Biochemistry, 1995. **227**(3): p. 715-22.
84. Gaster, M., et al., *A cellular model system of differentiated human myotubes*. APMIS: Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica, 2001. **109**(11): p. 735-744.
85. Wensaas, A.J., et al., *Cell-based multiwell assays for the detection of substrate accumulation and oxidation*. J Lipid Res, 2007. **48**(4): p. 961-967.
86. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
87. SABiosciences, A.Q.C. *Introduction To Real - Time Quantitative PCR (qPCR)*. [cited 2015 18.02]; Available from: <http://sabiosciences.com/manuals/IntrotoqPCR.pdf>.
88. Ow, Y.-L.P., et al., *Cytochrome c: functions beyond respiration*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2008. **9**(7): p. 532-542.
89. Dyar, K.A., et al., *Muscle insulin sensitivity and glucose metabolism are controlled by the intrinsic muscle clock*. Molecular Metabolism, 2014. **3**(1): p. 29-41.
90. Peronnet, F. & Massicotte, D., *Table of nonprotein respiratory quotient: an update*. Canadian journal of sport sciences, 1991. **16**(1): p. 23-29.
91. Unilabs. *Referanseverdier*. [cited 2015 10.04.]; Available from: <http://www.unilabs.no/Fagomrader/Unilabs-Laboratoriemedisin/Referanseverdier/>.
92. Manetta, J., et al., *Insulin and non-insulin-dependent glucose disposal in middle-aged and young athletes versus sedentary men*. Metabolism, 2001. **50**(3): p. 349-354.
93. Berggren, J.R., et al., *Glucose uptake in muscle cell cultures from endurance-trained men*. Medicine & Science in Sports & Exercise, 2005. **37**(4): p. 579-584.

94. Turcotte, L.P., et al., *Increased plasma FFA uptake and oxidation during prolonged exercise in trained vs. untrained humans*. American Journal of Physiology, 1992. **262**(6 Pt 1): p. 791-799.
95. Hessvik, N.P., et al., *Metabolic switching of human myotubes is improved by n-3 fatty acids*. J Lipid Res, 2010. **51**(8): p. 2090-2104.
96. Ukropcova, B., et al., *Dynamic changes in fat oxidation in human primary myocytes mirror metabolic characteristics of the donor*. J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1934-1941.
97. Gormley, S.E., et al., *Effect of intensity of aerobic training on VO2max*. Medicine & Science in Sports & Exercise, 2008. **40**(7): p. 1336-1343.
98. Williams, A.G. & Folland, J.P., *Similarity of polygenic profiles limits the potential for elite human physical performance*. Journal of Physiology, 2008. **586**(1): p. 113-121.
99. Ramos-Jimenez, A., et al., *The Respiratory Exchange Ratio is Associated with Fitness Indicators Both in Trained and Untrained Men: A Possible Application for People with Reduced Exercise Tolerance*. Clinical Medicine Insights: Circulatory, Respiratory and Pulmonary Medicine, 2008. **2**: p. 1-9.
100. Mauro, A., *Satellite cell of skeletal muscle fibers*. J Biophys Biochem Cytol, 1961. **9**: p. 493-495.
101. Katz, B., *The Terminations of the Afferent Nerve Fibre in the Muscle Spindle of the Frog*. Philosophical Transactions B, 1961. **243**(703): p. 221-240.
102. Bonavaud, S., et al., *Preparation of isolated human muscle fibers: a technical report*. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 2002. **38**(2): p. 66-72.
103. Blau, H.M. & Webster, C., *Isolation and characterization of human muscle cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1981. **78**(9): p. 5623-5627.
104. Konigsberg, I.R., *CELLULAR DIFFERENTIATION IN COLONIES DERIVED FROM SINGLE CELL PLATINGS OF FRESHLY ISOLATED CHICK EMBRYO MUSCLE CELLS*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1961. **47**(11): p. 1868-1872.
105. Jacobs, A.E., et al., *Palmitate oxidation and some enzymes of energy metabolism in human muscles and cultured muscle cells*. International Journal of Biochemistry, 1987. **19**(11): p. 1049-1054.
106. Henry, R.R., et al., *Insulin action and glucose metabolism in nondiabetic control and NIDDM subjects. Comparison using human skeletal muscle cell cultures*. Diabetes, 1995. **44**(8): p. 936-946.
107. Bylund-Fellenius, A.C., et al., *Energy metabolism in relation to oxygen partial pressure in human skeletal muscle during exercise*. Biochemical Journal, 1981. **200**(2): p. 247-255.
108. Sousa-Victor, P., et al., *Regulation of skeletal muscle stem cells through epigenetic mechanisms*. Toxicol Mech Methods, 2011. **21**(4): p. 334-342.
109. Bharathy, N., et al., *Epigenetic regulation of skeletal muscle development and differentiation*. Subcellular Biochemistry, 2013. **61**: p. 139-150.
110. Al-Khalili, L., et al., *Insulin action in cultured human skeletal muscle cells during differentiation: assessment of cell surface GLUT4 and GLUT1 content*. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2003. **60**(5): p. 991-998.
111. Redshaw, Z. & Loughna, P.T., *Oxygen concentration modulates the differentiation of muscle stem cells toward myogenic and adipogenic fates*. Differentiation, 2012. **84**(2): p. 193-202.

112. Pfaffl, M.W., *The ongoing evolution of qPCR*. Methods, 2010. **50**(4): p. 215-216.
113. Blomstrand, E. & Ekblom, B., *The needle biopsy technique for fibre type determination in human skeletal muscle--a methodological study*. Acta Physiol Scand, 1982. **116**(4): p. 437-42.
114. Løvås, G.G., *Statistikk - for universiteter og høyskoler*. 3 ed. 1999, Oslo: Universitetsforlaget AS.
115. Kramer, D.K., et al., *Direct activation of glucose transport in primary human myotubes after activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta*. Diabetes, 2005. **54**(4): p. 1157-1163.
116. Wang, L., et al., *Similar expression of oxidative genes after interval and continuous exercise*. Medicine & Science in Sports & Exercise, 2009. **41**(12): p. 2136-2144.
117. Koves, T.R., et al., *Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance*. Cell Metabolism, 2008. **7**(1): p. 45-56.
118. Kramer, D.K., et al., *Role of AMP kinase and PPARdelta in the regulation of lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(27): p. 19313-19320.
119. Kase, E.T., et al., *Liver X receptor antagonist reduces lipid formation and increases glucose metabolism in myotubes from lean, obese and type 2 diabetic individuals*. Diabetologia, 2007. **50**(10): p. 2171-2180.
120. Meex, R.C.R., et al., *Restoration of Muscle Mitochondrial Function and Metabolic Flexibility in Type 2 Diabetes by Exercise Training Is Paralleled by Increased Myocellular Fat Storage and Improved Insulin Sensitivity*. Diabetes, 2010. **59**(3): p. 572-579.
121. Göttlicher, M., et al., *Structural and metabolic requirements for activators of the peroxisome proliferator-activated receptor*. Biochem Pharmacol, 1993. **46**(12): p. 2177-2184.
122. Andersson, A., et al., *Fatty acid profile of skeletal muscle phospholipids in trained and untrained young men*. American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, 2000. **279**(4): p. 744-751.
123. Baguet, A., et al., *A new method for non-invasive estimation of human muscle fiber type composition*. PLoS One, 2011. **6**(7).

Appendiks

1. Medier til celledyrking

1.1 Utsåingsmedium

500 ml DMEM m/Glutamax m/ 1,0 g glukose

50 ml føtalt kalveserum

2,5 ml Pen/Strep 10 000 enheter/ml

2,5 ml Fungizone (250 µg/ml Amphotericin)

1.2 Proliferasjonsmedium

500 ml DMEM m/Glutamax m/ 1,0 glukose

10 ml føtalt kalveserum

10 ml Ultroser G

2,5 ml Pen/Strep 10 000 enheter/ml

2,5 ml Fungizone (250 µg/ml Amfotericin)

1.3 Differensieringsmedium

500 ml DMEM m/Glutamax m/ 1,0 g glukose

10 ml føtalt kalveserum

2,5 ml Pen/Strep 10 000 enheter/ml

2,5 ml Fungizone (250 µg/ml Amfotericin)

25 pmol insulin

1.4 SkGM – dyrkingsmedium

500 ml SkBM-medium (Lonza®)

10 ml føtalt kalveserum

2,5 ml Pen/Strep 10 000 enheter/ml

2,5 ml Fungizone (250 µg/ml Amfotericin)

5,0 ml l-Glutamin

SkGM Skeletal Muscle Growth SingleQuot Kit Supplements & Growth Factors (5,0 ml Fetuin,

5,0 ml BSA, 0,5 ml Dexamethasone, 0,5 ml GA-1000, 0,5 ml human Epidermal Growth Factor)

1.5 Frysemedium (per fryserør)

0,53 ml SkGM

0,33 ml føtalt kalveserum/føtalt bovint serum

133,3 µl 20 % DMSO

Lages umiddelbart før bruk og holdes avkjølt.

2. Andre medier

2.1 10x PBS (vaskebuffer)

80 g NaCl

2 g KH₂PO₄

29 g Na₂HPO₄ 2 H₂O

2 g KCl

ad. 1 l destillert H₂O

pH justeres til 7,2-7,4 med 1 M H₂SO₄

3. Medier til substratoksidasjonsmetoden

3.1 Radioaktiv glukose (200 µM)

200 µM [¹⁴C(U)]glukose (0,58 µCi/ml)

1 M L-karnitin

2,4 mM BSA (tilsettes etter at 3,2 ml er tatt ut til medium 2.2)

ad. Dulbeccos PBS m/4-(2-hydroksyetyl)-1-piperazinetansulfonsyre (HEPES) pH 7,3

3.2 Radioaktiv glukose (200 µM), 100 µM fettsyre

3,2 ml av medium 2.1

100 µM OA

3.3 Radioaktiv fettsyre (100 µM)

9 µM [¹⁴C]OA (0,5 µCi/ml)

91 µM OA

2,4 mM BSA

1 M L-karnitin

ad. Dulbeccos PBS m/ HEPES pH 7,3

3.4 Radioaktiv fettsyre (200 µM glukose)

3,2 ml av medium 2.3

200 µM glukose

3.5 Radioaktiv fettsyre (400 µM)

9 µM [¹⁴C]OA (0,5 µCi/ml)

391 µM OA

2,4 mM BSA

1 M L-karnitin

ad. Dulbeccos PBS m/ HEPES pH 7,3

3.6 Ikke-radioaktivt trappemedium

2,4 mM BSA

1 M L-karnitin

ad. Dulbeccos PBS m/ HEPES pH 7,3

3.7 Ikke-radioaktivt trappemedium (100 µM oljesyre)

100 µM oljesyre

2,4 mM BSA

1 M L-karnitin

ad. Dulbeccos PBS m/ HEPES pH 7,3

4. Medier til cDNA- syntetisering

4.1 Reaksjonsblanding for cDNA-syntetisering (per prøve)

13,2 µl DEPC-dHO + prøve

2,0 µl 10 x TaqMan RT Buffer

0,8 µl 25 x dNTP mix

2,0 µl 10 x RT Random hexamers

1,0 µl RNase inhibitor (20 U/µl)

1,0 µl Multiscribe Reverse Transcriptase (50 U/µl)

(Totalt 20 µl per rør)

5. Løsninger til kvantitativ polymerasekjedereaksjon (qPCR)

5.1 Standarder

- cDNA-mix: 2 µl per prøve (28 prøver gir et totalvolum på 56 µl)
- Standard 1000: 36 µl cDNA-mix, 144 µl dHO
- Standard 500: 90 µl standard 1000, 90 µl dHO
- Standard 250: 90 µl standard 500, 90 µl dHO
- Standard 125: 90 µl standard 250 90 µl dHO

5.2 Fortynning av primere (sluttkonsentrasjon 30 µM)

10 µl primer (300 µM)

90 µl dHO

5.3 Fortynning av cDNA-prøver (1:5)

Alle kontroller (DMSO) og GW501516-behandlede prøver:

(2,5 µl x 2 paralleller x 10 gener = 50 µl + 5 µl overskudd)

11 µl prøve

44 µl dHO

5.4 SYBR Green PCR-mix

12,5 µl SYBR Green Master Mix

0,25 µl Forward primer (se tabell 2.4)

0,25 µl Reverse primer (se tabell 2.4)

9,5 µl nukleasefritt vann

(Totalt 22,5 µl per prøve)

6. Inklusjons- og eksklusjonskriterier for deltakelse i atlet-studien

6.1 Inklusjonskriterier

Menn i alderen 19-40 år

Videre ble forsøkspersonene inndelt i to grupper på bakgrunn av test av VO₂maks:

Atletgruppen:

VO₂maks > 60 ml/min/kg

Trener jevnlig utholdenhetstrening

Appendiks

Utrentgruppen:

VO₂maks < 50 ml/min/kg

Trener ikke (mindre enn en gang i uken)

6.2 Eksklusjonskriterier

Røyk

Medikamentbruk

7 Forsøksoppsett

7.1 Forsøksoppsett 1 (96-brønners Corning® CellBIND® Surface-brett)

*, radioaktiv; Glu, glukose; K, kontroll (0,1 % DMSO); OA, oljesyre.

Glukoseoksidasjon (200 µl glukose)							Oljesyreoksidasjon (100 µl oljesyre)					
Radioaktivt medium <i>akutt før forsøk</i>		Glu*		Glu* +OA		Glu*	OA*		OA* +Glu		OA*	
GW 501516 <i>96 timer</i>		K	K	K	10 nM	10 nM	K	K	K	10 nM	10 nM	K
TTP <i>24 timer</i>			100 µM					100 µM				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
...H												

7.2 Forsøksoppsett 2 (96-brønners Corning® CellBIND® Surface-brett)

*, radioaktiv; Glu, glukose; K, kontroll (0,01 % DMSO); OA, oljesyre; T, ikke-radioaktivt forsøksmedium (trappemedium).

Oljesyreoksidasjon												
Radioaktivt medium <i>akutt før forsøk</i>		100 µM					400 µM*		T	T	T	
Tilstedeværelse av (akutt-behandling)				5 mM Glu	1 µM FCCP			1 µM FCCP			100 µM OA	
Tularik <i>96 timer</i>		K	K	K	K	1 µM	K	K	K	K	K	K
OA* <i>24 timer</i>		100 µM							100 µM	400 µM	100 µM	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
...H												

8 Oppsummering av resultater

8.1 Tabelloversikt over forskjeller for myotuber fra atlet- og utrentgruppen

36B4, syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0; CD36, "Cluster of differentiation" 36; CYC1, cytokrom c-1; GAPDH, glyseraldehyd 3-fosfatdehydrogenase; CPT, karnitin palmitoyltransferase; MYH7, myosin tungkjedegen- β ; MYH2, myosin tungkjedegen-2A; PDK, pyruvat dehydrogenase kinase; PGC1 α , Peroxisomproliferator-aktivert reseptor gamma koaktivator 1- α ; PPAR, Peroxisomproliferator-aktivert reseptor. \uparrow høyere verdi for gruppen ($p < 0,05$), -ingen forskjell mellom gruppene, °kun tendens ved korrigering for 36B4.

	Utrent, n=6	Atlet, n=6
Glukoseopptak, 4 t	-	-
Celleassosiert glukose, 4 t	-	-
Glukoseoksidasjon, 4 t	-	-
Oljesyreopptak, 4 t	-	-
Celleassosiert oljesyre, 4 t	-	-
Oljesyreoksidasjon, 4 t		\uparrow
β -oksidasjon, 4 t	-	-
Oljesyreopptak, 28 t		\uparrow
Celleassosiert oljesyre, 28 t	-	$\uparrow^{p=0,6}$
Oljesyreoksidasjon, 4 t etter 24 t forbehandling		\uparrow
β -oksidasjon, 24 t		\uparrow
Metabolsk fleksibilitet		
Oljesyresuppresjon		\uparrow
Glukosesuppresjon	-	-
Adapterbarhet	-	-
Substratregulert fleksibilitet	-	-
mRNA-ekspresjon		
CYC1	-	-
CPT1a	-	-
CPT1b	-	-
PGC1 α	-	-
CD36	-	-
MYH2	-	-
MYH7	-	-
PDK4	(-)	(-/ $\uparrow^{*p=0,1^{\circ}}$)

8.2 Tabelloversikt over behandlingseffekter for myotuber fra atlet- og utrentgruppen, i tillegg til for gruppene samlet

36B4, syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0; CD36, "Cluster of differentiation" 36; CYC1, cytokrom c-1; GAPDH, glyseraldehyd 3-fosfatdehydrogenase; CPT, karnitin palmitoyltransferase; LXR, lever-X-reseptor; MYH7, myosin tungkjedegen- β ; MYH2, myosin tungkjedegen-2A; PDK, pyruvat dehydrogenase kinase; PGC1 α , PPAR γ koaktivator-1 α . PPAR δ , \uparrow stimulering ($p < 0,05$ vs. DMSO (uten GW-behandling)), -ingen effekt vs. DMSO (uten GW-behandling), \downarrow lavere vs. utrent ($p < 0,05$).

Etter PPAR δ -aktivering	Utrent, n=6	Atlet, n=6	Alle, n=12
Glukoseopptak, 4 t	-	-	-
Celleassosiert glukose, 4 t	-	-	-
Glukoseoksidasjon, 4 t	-	-	-
Oljesyreopptak, 4 t	\uparrow	\uparrow	\uparrow
Celleassosiert oljesyre, 4 t	-	-	-
Oljesyreoksidasjon, 4 t	\uparrow	\uparrow	\uparrow
β -oksidasjon, 4 t	\uparrow $p=0,06$	-	\uparrow
CYC1	-	-	-
CPT1a	\uparrow $p=0,06$	\uparrow $p=0,06$	\uparrow
CPT1b	-	\uparrow $p=0,06$	\uparrow
PGC1 α	-	-	-
CD36	\uparrow	\uparrow	\uparrow
MYH2	-	-	-
MYH7	-	-	-
PDK4	\uparrow	\uparrow	\uparrow
GW-respons (%)			
Oljesyreopptak		\downarrow	
Oljesyreoksidasjon		\downarrow $p=0,06$	
Etter LXR-aktivering			
Oljesyreopptak, 4 t	-	-	\uparrow $p=0,06$
Celleassosiert oljesyre, 4 t	\uparrow $p=0,06$	-	\uparrow
Oljesyreoksidasjon, 4 t	\uparrow	\uparrow $p=0,09$	\uparrow
β -oksidasjon, 4 t	-	-	-
Etter behandling med 4-tiafettsyreanalog			
Glukoseopptak, 4 t	-	-	-
Celleassosiert glukose, 4 t	-	-	-
Glukoseoksidasjon, 4 t	-	-	-
Oljesyreopptak, 4 t	\uparrow	\uparrow	\uparrow
Celleassosiert oljesyre, 4 t	\uparrow	\uparrow $p=0,06$	\uparrow
Oljesyreoksidasjon, 4 t	\uparrow	\uparrow	\uparrow
β -oksidasjon, 4 t	-	-	-
